

РОЛЬ МЕМБРАННО-АССОЦИИРОВАННОГО БЕЛКА ТЕПЛООВОГО ШОКА HSP70 В МИГРАЦИИ КЛЕТОК ГЛИОБЛАСТОМЫ

Лихоманова Р. Б.^{1,2}, Фофанов Г. К.¹, Розанов О. П.¹, Гараев Т. Р.¹,
Аксенов Н. Д.², Зиганшин Р. Х.³, Юдинцева Н. М.^{1,2},
Бобков Д. Е.^{1,2}, Шевцов М. А.^{1,2}

Контактная информация:

Лихоманова Руслана Батыровна,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: tagaeva97@yandex.ru

Статья поступила в редакцию 26.12.2024
и принята к печати 19.06.2025

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр имени
В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской
Федерации, Научный центр мирового уровня «Центр
персонализированной медицины», Санкт-Петербург, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Институт цитологии Российской академии наук», Санкт-Петербург,
Россия

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Институт биоорганической химии имени академиков М. М. Шемякина
и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук», Москва, Россия

Резюме

Актуальность. Мембранно-ассоциированный белок теплового шока Hsp70 (mHsp70) избирательно экспрессируется в опухолевых, но не в нормальных клетках. Спектр функций mHsp70 до сих пор не до конца изучен. **Цель** — исследование роли mHsp70 в миграции клеток глиобластомы. **Материалы и методы.** В работе использовали клеточные линии С6 глиомы крысы, U251 и T98G глиобластомы человека, положительные по mHsp70. Каждую клеточную линию сортировали на две субпопуляции — с высокой (mHsp70⁺) и низкой (mHsp70⁻) экспрессией белка. Вклад mHsp70 в миграцию оценивали с помощью теста на застание раны, ручного трекинга единичных клеток и метода Transwell. В работе также исследовали влияние ингибиторов белка PES и JG-98 на клеточную подвижность. Для выявления возможных белковых партнеров mHsp70, регулирующих клеточную подвижность, проводили протеомный анализ липидных рафтов клеток T98G. **Результаты.** Субпопуляции mHsp70⁺ обладают более высокой скоростью движения (по данным ручного трекинга) и приводят к полному застанию раны за более короткий промежуток времени по сравнению с mHsp70⁻. Применение ингибиторов PES и JG-98 способствует снижению скорости движения, а также уменьшению количества инвазирующих клеток, при этом наибольший эффект наблюдается для субпопуляций mHsp70⁺. Протеомный анализ липидных рафтов клеток T98G выявил связь между mHsp70 и белками, участвующими в ремоделировании цитоскелета, внеклеточного матрикса, адгезии и миграции. **Заключение.** mHsp70 участвует в миграции клеток глиобластомы и может быть использован в качестве мишени для таранностики злокачественных новообразований.

Ключевые слова: глиобластома, ингибиторы mHsp70, липидные рафты, миграция клеток, шапероны, mHsp70

Для цитирования: Лихоманова Р.Б., Фофанов Г.К., Розанов О.П. и др. Роль мембранно-ассоциированного белка теплового шока Hsp70 в миграции клеток глиобластомы. Трансляционная медицина. 2025; 12(3): 283-294. DOI: 10.18705/2311-4495-2025-12-3-283-294. EDN: NQTQXP

THE ROLE OF MEMBRANE-ASSOCIATED HEAT SHOCK PROTEIN HSP70 IN MIGRATION OF GLIOBLASTOMA CELL

Ruslana B. Likhomanova^{1,2}, Georgii K. Fofanov¹, Oleg P. Rozanov¹, Timur R. Garaev¹, Nikolay D. Aksenov², Rustam Kh. Ziganshin³, Natalia M. Yudincheva^{1,2}, Danila E. Bobkov^{1,2}, Maxim A. Shevtsov^{1,2}

Corresponding author:

Ruslana B. Likhomanova,
Almazov National Medical Research Centre,
Akkuratova str., 2, Saint Petersburg, Russia,
197341.
E-mail: tagaeva97@yandex.ru

¹ Almazov National Medical Research Centre, World-Class Research Centre for Personalized Medicine, Saint Petersburg, Russia

² Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

³ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Received 26 December 2024; accepted
19 June 2025

Abstract

Background. Membrane-associated heat shock protein Hsp70 (mHsp70) is selectively expressed in tumor, but not in normal cells. The mHsp70 functions are not fully understood. **Objective:** to study the role of mHsp70 in glioblastoma cell migration. **Design and methods.** mHsp70-positive rat glioma C6 and human glioblastoma U251 and T98G cell lines were used. Each cell line was sorted into two subpopulations: with high (mHsp70⁺) and low (mHsp70⁻) protein expression. The contribution of mHsp70 to migration was assessed using a wound-healing assay, manual single-cell tracking, and the Transwell analysis. We also examined the effect of Hsp70 inhibitors PES and JG-98 on cell motility. To identify potential protein partners of mHsp70 that regulate cell motility, proteomic analysis of lipid rafts of T98G cells was performed. **Results.** mHsp70⁺ subpopulations have a higher mean speed (according to manual tracking) and lead to complete wound healing in a shorter period of time compared to mHsp70⁻. The use of PES and JG-98 inhibitors helps to reduce the speed of movement, as well as the number of invasive cells, with the greatest effect observed for mHsp70⁺ subpopulations. Proteomic analysis of T98G cells lipid rafts revealed a relationship between mHsp70 and proteins involved in cytoskeleton and extracellular matrix remodeling, adhesion and migration. **Conclusion.** mHsp70 is involved in glioblastoma cell migration and can be used as a target for malignant neoplasm therapy.

Key words: cell migration, chaperones, glioblastoma, lipid rafts, mHsp70, mHsp70 inhibitors

For citation: Likhomanova RB, Fofanov GK, Rozanov OP, et al. The role of membrane-associated heat shock protein Hsp70 in migration of glioblastoma cell. Translational Medicine. 2025; 12(3): 283-294. (In Rus.) DOI: 10.18705/2311-4495-2025-12-3-283-294. EDN: NQTQXP

Список сокращений: ДИ — доверительный интервал, НСД — N-концевой нуклеотид-связывающий домен Hsp70, ССД — С-концевой субстрат-связывающий домен Hsp70, ФБС — фетальная бычья сыворотка, ФСБ — фосфатно-солевой буфер, DAPI — 4',6-диамидино-2-фенилиндо́л, HSPs — белки теплового шока, mHsp70 — мембранно-ассоциированный белок теплового шока

70, mHsp70⁺ — субпопуляция клеток с высокой экспрессией mHsp70, mHsp70⁻ — субпопуляция клеток с низкой экспрессией mHsp70, mHsp70^{Исх} — нативная неотсортированная популяция клеток.

Введение

Белки теплового шока (англ. Heat shock proteins, HSPs) представляют собой класс высококонсерва-

тивных белков-шаперонов, выполняющих различные функции в клетке. В зависимости от молекулярной массы выделяют несколько семейств HSPs, в частности семейство HSP70, которое насчитывает по меньшей мере 13 членов с массой около 70 кДа [1]. Стресс-индуцируемые члены семейства Hsp70-1 (HspA1A) и Hsp70-2 (HspA1B), называемые в совокупности Hsp70, экспрессируются в клетке при различных стрессорных воздействиях, например, при тепловом шоке, ионизирующем излучении, оксидативном стрессе и т. д. [1]. Шаперон Hsp70 состоит из двух доменов — С-концевого субстрат-связывающего домена (ССД) и N-концевого нуклеотид-связывающего домена (НСД), соединенных подвижным линкером. Основные функции Hsp70 в эукариотических клетках включают в себя фолдинг/рефолдинг неправильно уложенных белков и полипептидов, транслокацию и деградацию белков, регуляцию процессов апоптоза и аутофагии [2–5].

Известно, что Hsp70 сверхэкспрессируется в опухолевых клетках различного происхождения, в том числе в клетках глиобластомы, обладающих высоким миграционным и инвазивным потенциалом [6]. Повышенный уровень экспрессии белка в опухолевых клетках способствует его избирательному накоплению на плазматической мембране, что позволяет использовать Hsp70 в качестве мишени для диагностики и терапии (гераностики) злокачественных новообразований. Точные механизмы заякоривания белка на мембране все еще не до конца изучены, поскольку структура шаперона не несет в себе какой-либо известной трансмембранной последовательности. Предполагается, что закрепление белка происходит именно за счет его взаимодействия с липидными молекулами в детергент-устойчивых областях мембраны (липидных рафтах) посредством электростатических и гидрофобных взаимодействий [7–10].

Большой интерес представляют функции мембранно-ассоциированного Hsp70 (mHsp70) в опухолевых клетках. Предполагается, что mHsp70 способствует стабилизации мембраны и формированию квазиинтердигитационной липидной фазы, формирует ион-проницаемые каналы, участвует в процессах внеклеточного экспорта и передачи сигналов [7, 11, 12]. Некоторые исследователи связывают повышенную экспрессию Hsp70 в опухолевых клетках с их миграционной активностью, способностью к инвазии и метастазированию [13–16]. Так, например, нокдаун Hsp70 с помощью малых РНК, образующих шпильки, существенно подавляет инвазию и миграцию клеток колоректального рака COLO205, HCT116 и рака молочной

железы MDAMB231, MCF7 [13, 14]. В другом исследовании показано, что сверхэкспрессия изоформы 14-3-3 σ (стратифин) индуцирует экспрессию фактора теплового шока 1 α (HSF1 α) и Hsp70 в клетках гепатоцеллюлярной карциномы, что, в свою очередь, увеличивает подвижность клеток, опосредованную сигнальным путем GSK3 β / β -катенин [16]. Однако настоящие работы не позволяют оценить прямой вклад mHsp70 в миграцию и инвазию клеток, поскольку белок не дифференцирован от своих цитозольной и ядерной локализаций.

В настоящем исследовании мы показали, что mHsp70 влияет на миграционные характеристики клеток глиобластомы, при этом уровень представленности белка на мембране коррелирует с подвижностью клеток, а применение низкомолекулярных ингибиторов Hsp70 приводит к значительному снижению миграционного потенциала.

Материалы и методы

Культивирование клеток. Клеточные линии глиомы крысы C6 и глиобластомы человека T98G были получены в Российской коллекции клеточных культур (ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия). Клеточная линия глиобластомы человека U251 была предоставлена ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировали в среде DMEM/F-12 (Gibco, США) с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки (ФБС) (HyClone, США) и 50 мкг/мл гентамицина (Gibco, США) при 37 °C и 5 % CO₂.

Конфокальная микроскопия. Наличие mHsp70 на мембране клеток C6, U251 и T98G подтверждали с использованием конфокальной системы Olympus FV3000 (Olympus, Япония). Клетки культивировали на покровных стеклах, промывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ) и инкубировали с FITC-конъюгированными моноклональными антителами к Hsp70 (MultiImmune, Германия) в течение 30 минут на льду. После инкубации клетки фиксировали 10 % формалином (Sigma-Aldrich, США); стекла монтировали с использованием монтировочной среды, содержащей ядерный краситель 4',6'-диамидино-2-фенилиндола (DAPI; Ibbidi, Германия).

Проточная цитометрия и сортировка клеток. Анализ экспрессии mHsp70 проводили с помощью проточного цитометра CytoFLEX (Beckman Coulter, США). Суспензию клеток C6, U251 и T98G инкубировали с FITC-конъюгированными моноклональными антителами к Hsp70 (MultiImmune,

Германия) в течение 30 минут на льду и отмывали холодным ФБС. В качестве контроля использовали неокрашенные клетки, а также клетки, инкубированные с FITC-конъюгированными антителами к IgG1 (Beckman Coulter, Германия). Основываясь на полученных цитограммах, каждую клеточную линию сортировали на две субпопуляции — с высокой (mHsp70⁺) и низкой (mHsp70⁻) экспрессией mHsp70. Флуоресцентно-активированную сортировку клеток проводили с помощью S3e Cell Sorter (Bio-Rad, США). Процентное содержание субпопуляций mHsp70⁺ и mHsp70⁻ в общей популяции клеток C6, U251 и T98G составило около 10 ± 5 % и 17 ± 5 % соответственно.

Выделение липидных рафтов и их хромато-масс-спектрометрический анализ. Липидные рафты выделяли из клеток T98G с помощью лизиса неионогенным детергентом и прерывистого центрифугирования в градиенте сахарозы, как описано в [17]. Вкратце, клеточный осадок инкубировали в 1 мл буфера для лизиса в течение 15 минут на льду. Лизаты гомогенизировали путем пропускания через инъекционную иглу 0,22G и центрифугировали в течение 10 минут при 10 000 об/мин и +4 °С. Смешивали 0,4 мл супернатанта с 0,6 мл OptiPrep (Serumwerk Bernburg AG, Норвегия) и помещали на дно тонкостенной ультрапрозрачной пробирки с открытым верхом объемом 5 мл (Beckman Coulter, Германия). Поверх образца аккуратно наслаивали по 1 мл растворов OptiPrep (50 %, 40 %, 35 %, 0 %) в лизирующем буфере. Пробирки ультрацентрифугировали с помощью Optima XPN90 (Beckman Coulter, Германия) в течение 18 часов при 42 000 об/мин и +4 °С. После чего пробирку делили на 10 фракций и собирали фракции № 3–5, как наиболее обогащенные липидными рафтами [17]. Для последующего хромато-масс-спектрометрического анализа проводили гидролиз выделенных белков трипсином по методу, описанному в [18]. Хромато-масс-спектрометрический анализ выполняли с использованием хроматографа Ultimate 3000 Nano LC System (Thermo Fisher Scientific, США), соединенного с масс-спектрометром Orbitrap Lumos Tribrid mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, США) посредством наноэлектроспрейного источника (Thermo Fisher Scientific, США). Масс-спектрометрические данные анализировали с использованием программы Peaks studio 10.0 (Bioinformatics Solutions Inc., Канада) [19]; идентификацию белков выполняли путем поиска корреляции tandemных масс-спектров с базой данных белковых последовательностей человека Uniprot SwissProt. Для по-

строения белок-белковых сетей взаимодействия и визуализации данных использовали платформу Cytoscape v3.10.2.

Тест на зарастание раны. Субпопуляции mHsp70⁺ и mHsp70⁻ клеток C6, U251 и T98G культивировали до достижения монослоя. С помощью пластикового наконечника на 200 мкл на дне планшета формировали царапину, которую затем фотографировали каждые 30 минут до полного зарастания с помощью системы CellVoyager™ CQ1 (Yokogawa, Япония). В качестве контроля использовали нативную неотсортированную популяцию клеток — mHsp70^{Исх}. Эксперимент проводили в условиях сниженного содержания ФБС (2 %). Площадь раны (%) представляли в виде среднего значения ± стандартное отклонение.

Ручной трекинг единичных клеток. Характеристики подвижности (средняя скорость, прямизна и извилистость трека) субпопуляций клеток C6, U251 и T98G исследовали с помощью долгосрочной прижизненной визуализации на системе CellVoyager™ CQ1 (Yokogawa, Япония). Клетки высевали в 12-луночный планшет с конфлюэнтностью ~10 %. Для исследования влияния ингибиторов Hsp70 на характеристики подвижности использовали PES (Sigma-Aldrich, США), действующий на ССД белка, в концентрации 1 мкМ, и JG-98 (MedChemExpress, США), действующий на НСД, в концентрации 50 нМ. Ингибиторы добавляли в среду непосредственно перед началом эксперимента; используемые концентрации не влияли на жизнеспособность клеток (по данным МТТ-теста; данные не представлены). Съемку проводили в течение 24 часов с интервалом 15 минут с использованием лазера с длиной волны 405 нм. Обработку полученных изображений, построение треков движения ($n_{\text{треков}} \geq 50$ в группе) и их анализ выполняли с использованием программ ImageJ (НИН, США) и RStudio 4.0.2. (Posit PBC, США).

Трансвелл-анализ. Для анализа миграционной активности клеток использовали систему Transwell (NEST, Китай), в которой направленное движение клеток через проницаемую PET-мембрану (диаметр пор 3,0 мкм) обуславливается искусственно созданным градиентом концентраций хемоаттрактанта ФБС. Субпопуляции mHsp70⁺ и mHsp70⁻ клеток C6, U251 и T98G помещали в верхнюю камеру в среду без ФБС, в нижнюю — питательную среду с 10 % ФБС. В качестве контроля использовали клетки mHsp70^{Исх}. Через 48 часов мембрану промывали ФБС, фиксировали 10 % формалином (Sigma-

Aldrich, США) в течение 20 минут и окрашивали 0,1 % кристаллическим фиолетовым (Servicebio, Китай) в течение 20 минут. Не прошедшие через мембрану клетки удаляли с помощью ватного тампона. Используя инвертированный микроскоп Nikon Eclipse TS100 (Nikon, Япония), оснащенный системой фиксации изображений, на каждой мембране ($n = 3$ в группе) фотографировали 10 непрерывающихся полей зрения.

Статистическая обработка. Статистическую обработку выполняли с помощью программы GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., США). Все эксперименты имели не менее трех независимых повторов. Данные представляли в виде среднего значения \pm стандартное отклонение или медианы с 95 % доверительным интервалом (ДИ). Проверку данных на нормальность проводили с использованием тестов Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка. Для выявления статистически значимых различий использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни.

Результаты

В настоящей работе роль mHsp70 в миграции клеток исследовали с использованием клеточных линий глиомы крысы C6, глиобластомы человека

U251 и T98G. С помощью конфокальной микроскопии и проточной цитометрии показали, что клетки C6, U251 и T98G положительны по mHsp70 (рис. 1 А, Б). Протеомный анализ липидных рафтов, выделенных из клеток T98G, выявил наличие на мембране не только исследуемого стресс-индуцируемого HSP70, но и других представителей белков-шаперонов из семейств HSP70, HSP90, малых sHSP (табл. 1). Сеть белок-белковых взаимодействий, построенная для Hsp70, свидетельствует о его взаимосвязи с белками, участвующими в миграции, ремоделировании цитоскелета, внеклеточного матрикса, — тубулин-бета, тубулин альфа-4А, миозин-9, интегрин бета-1, альфа-енолаза и малая ГТФаза RhoA (рис. 1 В).

С помощью флуоресцентно-активированной сортировки каждую клеточную линию разделили на две субпопуляции — mHsp70⁺ и mHsp70⁻. Последующий тест-царапина показал, что субпопуляции mHsp70⁺ приводят к полному зарастанию раны за более короткий промежуток времени по сравнению с mHsp70⁻ (рис. 2 А, Б).

Для сравнения миграционных характеристик (средняя скорость, прямизна и извилистость траектории) единичных клеток субпопуляций mHsp70⁺ и mHsp70⁻ проводили прижизненную визуализацию клеток с последующим построением

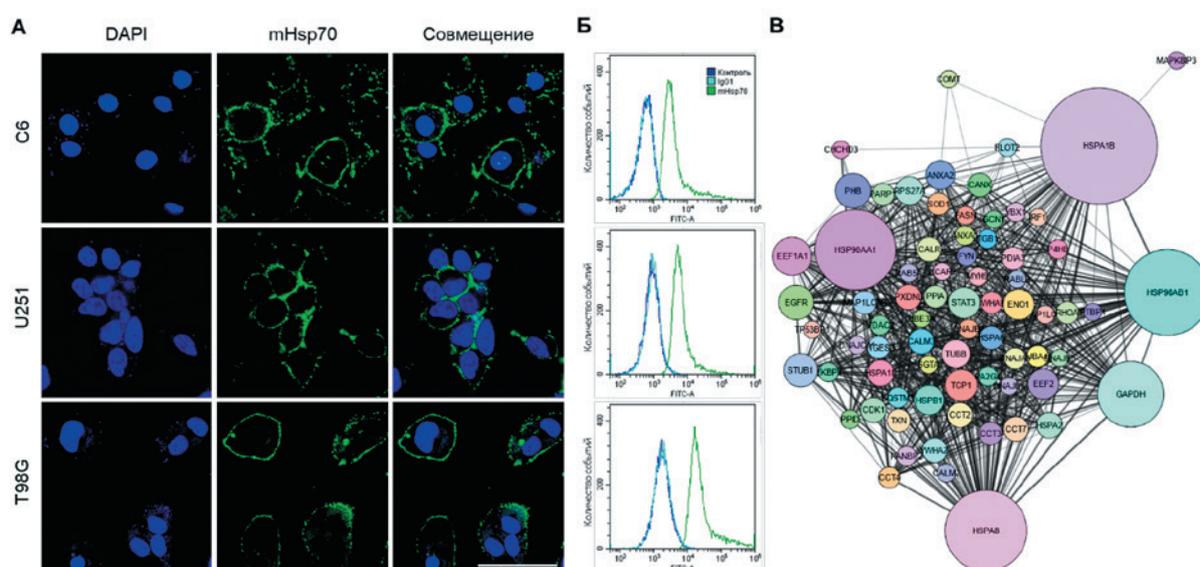


Рис. 1. Экспрессия mHsp70 в клетках C6 глиомы крысы, U251 и T98G глиобластомы человека

А — конфокальные микрофотографии, ядра (синие) окрашивали DAPI, mHsp70 (зеленый) — антителами к Hsp70, масштабная линейка 50 мкм; Б — проточная цитометрия клеток, окрашенных на mHsp70; В — сеть белковых интеракторов Hsp70.

Figure 1. Expression of mHsp70 in C6 rat glioma, U251, and T98G human glioblastoma cells

A — confocal micrographs, nuclei (blue) were stained with DAPI, mHsp70 (green) — with antibodies to Hsp70, scale bar 50 μ m; B — flow cytometry of cells stained for mHsp70; C — network of Hsp70 protein interactors.

Таблица 1. Шаперонный кластер, расположенный в липидных рафтах клеток T98G глиобластомы человека

Table 1. Chaperone cluster located in lipid rafts of T98G human glioblastoma cells

Белок (альтернативное название)	UniProt ID	Кодирующий ген	Представленность в шаперонном кластере, %
HspA1B (Hsp70-2)	P0DMV9	<i>HSPA1B</i>	9,53
HspA1L (Hsp70-1L)	P34931	<i>HSPA1L</i>	9,57
HspA2 (Hsp70.2)	P54652	<i>HSPA2</i>	9,52
HspA6 (Hsp70-6)	P17066	<i>HSPA6</i>	9,66
HspA7 (Hsp70-7)	P48741	<i>HSPA7</i>	5,47
HspA8 (Hsc70)	P11142	<i>HSPA8</i>	9,64
HSPC1 (Hsp90- α)	P07900	<i>HSP90AA1</i>	11,51
HSPC2 (Hsp90- α A2)	Q14568	<i>HSP90AA2P</i>	5,35
HSPC3 (Hsp90- β)	P08238	<i>HSP90AB1</i>	11,32
HSPCP1 (Hsp90- β C)	Q58FF7	<i>HSP90AB3P</i>	9,29
HSP90- β 2 (Hsp90- β B)	Q58FF8	<i>HSP90AB2P</i>	6,03
HspB1 (Hsp27)	P04792	<i>HSPB1</i>	3,10

треков движения (рис. 3 А). Для клеточных линий C6, U251 и T98G показали, что субпопуляции mHsp70⁺ двигаются быстрее, чем mHsp70⁻ (рис. 3 Б; $p \leq 0,01$, $p \leq 0,0001$, $p = 0,2943$ соответственно). Так, например, медианы средних скоростей с 95 % ДИ для субпопуляций mHsp70⁺ и mHsp70⁻ клеток U251 составили 16,17 [15,49; 17,12] и 13,93 [12,73; 14,77] мкм/ч соответственно. Статистический анализ прямизны и извилистости траектории движения не выявил достоверных отличий.

Для того чтобы оценить вклад каждого из доменов Hsp70 в миграционную активность, использовали ингибиторы Hsp70 — PES, действующий на ССД, и JG-98, действующий на НСД, в нетоксичных для клеток концентрациях. Как и ожидалось, применение ингибиторов способствовало снижению средней скорости и изменению характера подвижности клеток C6, U251 и T98G, при этом более выраженный эффект наблюдали именно для субпопуляций mHsp70⁺. Значительных различий между действием ингибиторов PES и JG-98 не выявили, что может свидетельствовать о том, что для опосредования миграции белку необходимо нормальное функционирование обоих доменов. Полученные результаты также подтвердили с использованием метода Transwell (рис. 4 А, Б), где субпопуляции mHsp70⁺ характеризовались более высокой миграционной активностью, которая под

действием ингибиторов снижалась в 1,5–2 раза в зависимости от клеточной линии.

Обсуждение

HSPs являются важными белковыми регуляторами и координаторами различных процессов в клетке. Основная роль HSPs связана с поддержанием нормального уровня внутриклеточного протеостаза, нарушение которого наблюдается при развитии заболеваний различного генеза, в том числе рака. Сверхэкспрессия Hsp70 в опухолевых клетках способствует их выживанию за счет влияния на процессы апоптоза и аутофагии [20, 21].

Помимо внутриклеточной локализации, Hsp70 избирательно экспрессируется на мембране клеток различных солидных и гематологических злокачественных новообразований, но не на мембране нормальных клеток. Ранее нами было показано, что опухолевая ткань, полученная в ходе операций по удалению мультиформной глиобластомы, обладает повышенным содержанием mHsp70 по сравнению с нормальной тканью [22]. Известно, что мультиформная глиобластома характеризуется высокой степенью миграции и инвазии в окружающую здоровую ткань головного мозга, в связи с чем мы предположили, что mHsp70 может быть вовлечен в подвижность клеток опухолей центральной нервной системы.

Мы показали, что используемые в работе клеточные линии глиомы крысы C6 и глиобластомы человека U251 и T98G положительны по mHsp70, причем каждая клеточная линия характеризуется наличием субпопуляции с высокой представленностью белка (около 5–15 % от общего количества клеток). Принимая во внимание предположение о том, что mHsp70 локализуется в области липидных рафтов, мы выделили данные участки мембраны из клеток T98G и провели их хромато-масс-спектрометрический анализ. В дополнение к исследуемому нами стресс-индуцируемому белку Hsp70, протеомный анализ также выявил наличие на мембране целого кластера шаперонов, включая других представителей из семейств HSP70, HSP90 и малых HSPs. Построение сети бе-

лок-белковых взаимодействий, центром организации которой является Hsp70, позволило выявить основных интеракторов белка. Среди таких белков, помимо своих ко-шаперонов, мы обнаружили глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу, рецептор эпидермального фактора роста, бета-катенин, флотеллин-2 и др. Интересным оказалось то, что среди интеракторов Hsp70 было большое количество белков, участвующих в ремоделировании цитоскелета, адгезии и миграции клетки. Это тубулин-бета, тубулин альфа-4A, миозин-9, интегрин бета-1, альфа-енолаза и малая ГТФаза RhoA. Все это свидетельствует о том, что mHsp70 может быть вовлечен в процессы миграции и инвазии опухолевых клеток. Однако мы предполагаем, что для обеспечения процессов клеточной подвижно-

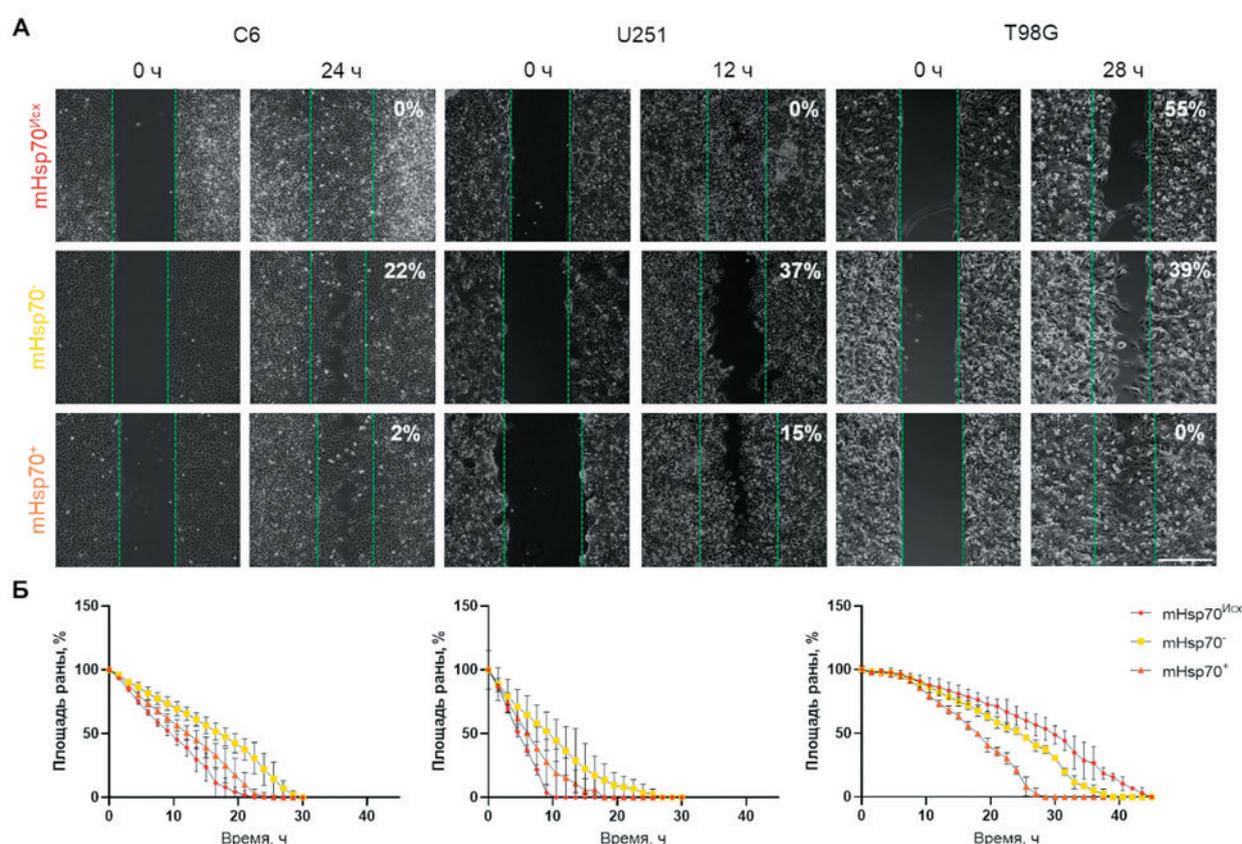


Рис. 2. Тест на заращание раны субпопуляций клеток C6, U251 и T98G с различной экспрессией mHsp70

A — фазово-контрастные микрофотографии субпопуляций клеток C6, U251 и T98G, в правом верхнем углу указаны площади незакрытой раны (%) в момент съемки представленного изображения, эксперимент проводили в условиях сниженного содержания ФБС (2 %), масштабная линейка 500 мкм; B — график зависимости площади раны (%) от времени (ч), данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение.

Figure 2. Wound-healing assay of C6, U251, and T98G subpopulations with different mHsp70 expression

A — phase-contrast micrographs of C6, U251, and T98G cell subpopulations, the area of the unclosed wound (%) at the time the image was taken is indicated in the upper right corner, scale bar 500 μ m; B — graph of wound area (%) versus time (h), data are presented as mean \pm standard deviation.

сти и, возможно, других функций клетки (например, ассоциации с внеклеточным матриксом или транспорта молекул через липидный бислой) необходимо присутствие всего ансамбля представителей HSPs для полноценного функционирования шаперонного аппарата на поверхности плазматической мембраны.

Ранее мы показали, что Hsp70 способствует интердигитации липидных рафтов, что, в свою очередь, может оказывать колоссальное влияние на функционирование мембранных белков и передачу сигналов [7]. Из литературы известна сильная ассоциация малой ГТФазы Rac1 с солидными опухолями [23]. Мы предполагаем, что Hsp70 в комплексе с другими шаперонами стабилизирует липидные рафты и поддерживает усиленную сигнализацию от ассоциированных с рафтами малых ГТФаз семейства Rho, что по-

зволяет клеткам реализовывать высокоинвазивный фенотип.

Для того чтобы подтвердить предположения об участии mHsp70 в подвижности клеток глиобластомы, мы отсортировали используемые клеточные линии по уровню представленности белка на субпопуляции mHsp70⁺ и mHsp70⁻. Результаты теста на застывание раны, прижизненного анализа траектории единичных клеток и метода Transwell показали, что субпопуляции mHsp70⁺ обладают более высокой миграционной активностью по сравнению с субпопуляциями mHsp70⁻, при этом степень представленности белка коррелирует с подвижностью клеток. Использование ингибиторов Hsp70 позволяет снизить миграционный потенциал клеток глиобластомы почти вдвое, что доказывает перспективность их применения для сдерживания роста и прогрессии опухоли. Отсутствие значимых

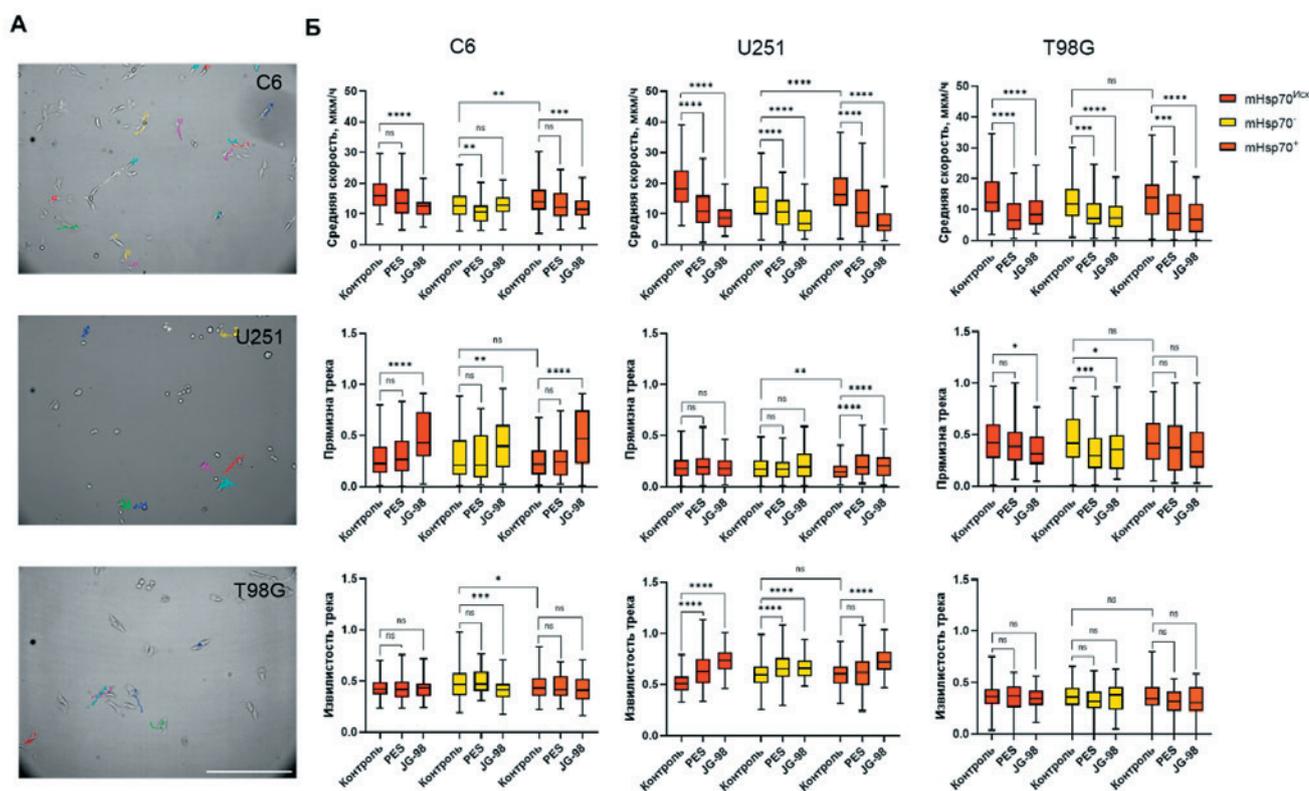


Рис. 3. Ручной трекинг единичных клеток субпопуляций C6, U251 и T98G с различной экспрессией mHsp70, обработанных ингибиторами PES и JG-98

A — пример треков движения, масштабная линейка 500 мкм; B — графики характеристик подвижности (средняя скорость, прямизна, извилистость траектории), данные представлены в виде медианы с 95 % ДИ. Статистическая значимость представлена как ns $p \geq 0,05$, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$.

Figure 3. Manual single-cell tracking of C6, U251, and T98G subpopulations with different mHsp70 expression treated with PES and JG-98

A — an example of movement tracks, scale bar 500 μm ; B — graphs of motility characteristics (mean speed, straightness, sinuosity of track), data are presented as a median with 95 % CI. Statistical significance is presented as ns $p \geq 0.05$, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$.

различий между действием ингибиторов PES и JG-98 свидетельствует о равнозначном вкладе каждого из доменов Hsp70 в подвижность. Несомненно, настоящие результаты требуют дальнейшего подтверждения на молекулярном уровне, поскольку изменение миграционного потенциала клеток сопровождается изменением профиля экспрессии, например, маркеров эпителиально-мезенхимального перехода, стволовости, ключевых молекул, регулирующих подвижность.

Возможным механизмом, объясняющим связь mHsp70 с повышенным метастазированием и инвазией раковых клеток, может быть участие шаперонов в опосредовании функций молекул, от-

ветственных за ремоделирование внеклеточного матрикса, путем модификации таких ферментов, как матриксные металлопротеиназы, активатор плазминогена, белки лизилоксидазы, катепсины [24]. Действительно, внеклеточные Hsp70 и Hsp90α помогают функционированию матриксной металлопротеиназы-2, активатора плазминогена, белка, подобного лизилоксидазе-2, и фибронектина, в то время как ингибирование этих шаперонов приводит к снижению миграции раковых клеток [25–28]. Предположительно, и другие члены семейств HSPs (Hsp27, Hsp40, Нор — организующий белок Hsp70/Hsp90) также участвуют в модуляции активности ферментов внеклеточ-

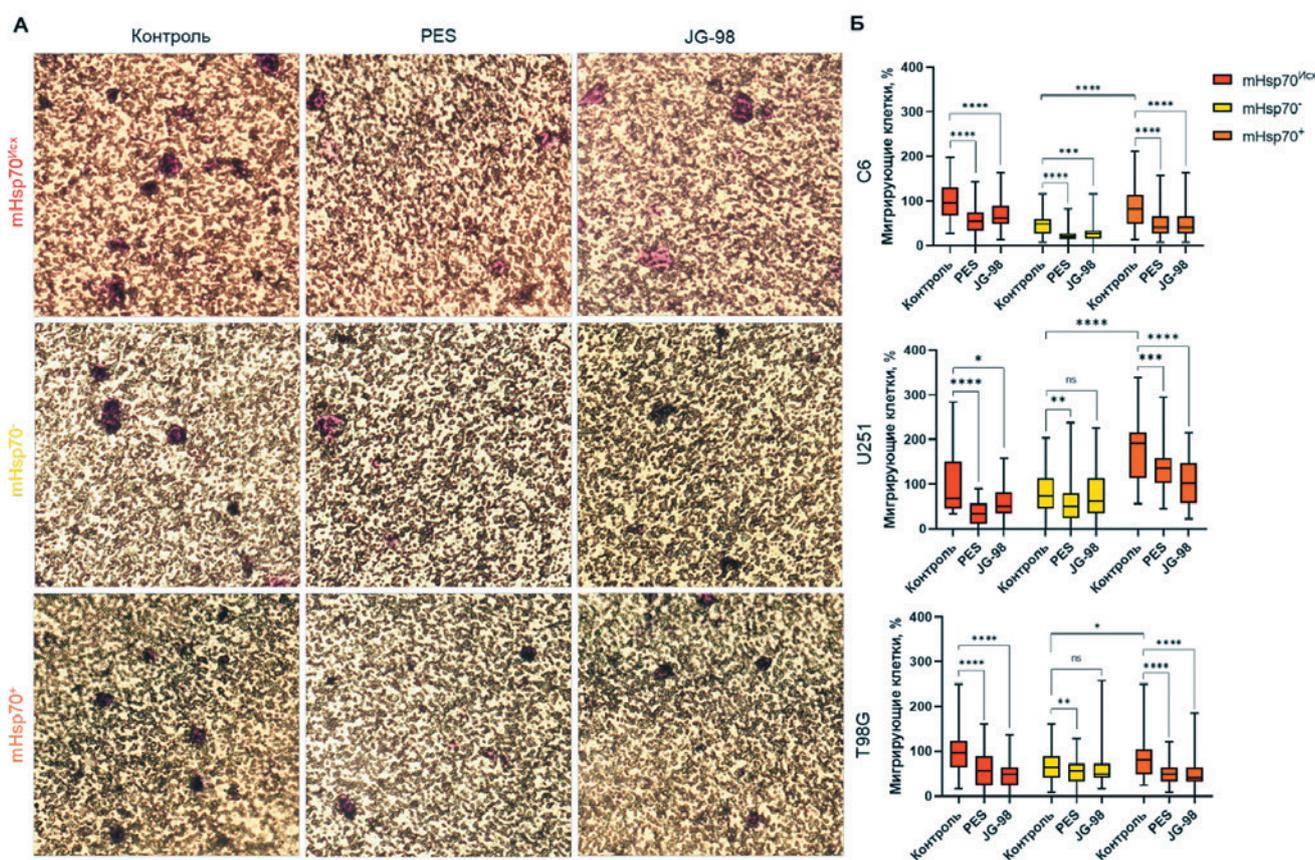


Рис. 4. Transwell-анализ субпопуляций клеток C6, U251 и T98G с различной экспрессией mHsp70, обработанных ингибиторами PES и JG-98

А — пример визуализации субпопуляций клеток C6, мигрировавших через пористую мембрану; Б — графики сравнения количества мигрировавших клеток (%) субпопуляций, обработанных ингибиторами PES и JG-98, данные представлены в виде медианы с 95 % ДИ. Статистическая значимость представлена как ns $p \geq 0,05$, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$.

Figure 4. Transwell analysis of C6, U251 and T98G cell subpopulations with different mHsp70 expression treated with PES and JG-98 inhibitors

А — an example of visualization of C6 cell subpopulations that migrated through a porous membrane; Б — graphs comparing the number of migrated cells (%) of subpopulations treated with PES and JG-98 inhibitors, data are presented as a median with 95 % CI. Statistical significance is presented as ns $p \geq 0.05$, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$.

ного матрикса [25, 29, 30]. Вероятно, шаперонный аппарат на поверхности плазматической мембраны обеспечивает поддержание структуры и работу белков, которые, в свою очередь, определяют миграцию клетки. Задачей наших будущих исследований будет изучение прямой связи закрепленных на мембране шаперонов с компонентами внеклеточного матрикса, их роли в поддержании архитектуры матрикса и миграции раковых клеток, а также выявление роли кластера HSPs в поддержании других белков.

Заключение

Мембранно-ассоциированный белок mHsp70 участвует в подвижности клеток глиобластомы. Наличие белка на мембране коррелирует с миграционной и инвазивной активностью клеток. Следует отметить, что Hsp70 присутствует в липидных рафтах в тесной связи с другими шаперонами из семейств HSP70, HSP90 и малых HSPs, формирующих целый шаперонный кластер. По-видимому, активная работа такого кластера белков на мембране и его влияние на функционирование своих прямых интеракторов может определять поведение раковой клетки. Все это указывает на необходимость дальнейшего исследования роли белка в процессах клеточной подвижности с использованием комплексного протеомного анализа других HSPs, а также их интерактивных сетей. Избирательное ингибирование мембранных форм шаперонов из различных семейств может способствовать снижению миграционного/метастатического потенциала опухолевых клеток, препятствуя их активному распространению и прогрессии заболевания.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциально-го конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Финансирование / Funding

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2022-301 от 20.04.2022). / The research was carried out with the financial support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Agreement No. 075-15-2022-301 dated 04.20.2022).

Список литературы / References

1. Radons J. The human HSP70 family of chaperones: where do we stand? *Cell Stress Chaperones*. 2016;21(3):379–404. DOI:10.1007/s12192-016-0676-6.

2. Kohler V, Andréasson C. Hsp70-mediated quality control: Should I stay or should I go? *Biol. Chem.* 2020;401(11):1233–1248. DOI:10.1515/hsz-2020-0187.

3. Lang BJ, Prince TL, Okusha Y, et al. Heat shock proteins in cell signaling and cancer. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 2022;1869(3):119187. DOI:10.1016/j.bbamcr.2021.119187.

4. Liu Y, Zhou L, Xu Y, et al. Heat Shock Proteins and Ferroptosis. *Front Cell Dev Biol.* 2022;10:864635. DOI:10.3389/fcell.2022.864635.

5. Morán Luengo T, Mayer MP, Rüdiger SGD. The Hsp70-Hsp90 Chaperone Cascade in Protein Folding. *Trends Cell Biol.* 2019;29(2):164–177. DOI:10.1016/j.tcb.2018.10.004.

6. Vollmann-Zwerenz A, Leidgens V, Feliciello G, et al. Tumor Cell Invasion in Glioblastoma. *Int J Mol Sci.* 2020;21(6):1932. DOI:10.3390/ijms21061932.

7. Tagaeva R, Efimova S, Ischenko A, et al. A new look at Hsp70 activity in phosphatidylserine-enriched membranes: chaperone-induced quasi-interdigitated lipid phase. *Sci Rep.* 2023;13(1):19233. DOI:10.1038/s41598-023-46131-x.

8. Makky A, Czajor J, Konovalov O, et al. X-ray reflectivity study of the heat shock protein Hsp70 interaction with an artificial cell membrane model. *Sci Rep.* 2023;13(1):19157. DOI:10.1038/s41598-023-46066-3.

9. Gehrmann M, Liebisch G, Schmitz G, et al. Tumor-specific Hsp70 plasma membrane localization is enabled by the glycosphingolipid Gb3. *PLoS One.* 2008;3(4):e1925. DOI:10.1371/journal.pone.0001925.

10. De Maio A, Hightower L. The interaction of heat shock proteins with cellular membranes: a historical perspective. *Cell Stress Chaperones.* 2021;26(5):769–783. DOI:10.1007/s12192-021-01228-y.

11. De Maio A. Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the Stress Observation System: a form of communication during injury, infection, and cell damage. It is never known how far a controversial finding will go! Dedicated to Ferruccio Ritossa. *Cell Stress Chaperones.* 2011;16(3):235–249. DOI:10.1007/s12192-010-0236-4.

12. Zhang Y, Tseng CC, Tsai YL, et al. Cancer cells resistant to therapy promote cell surface relocation of GRP78 which complexes with PI3K and enhances PI(3,4,5)P3 production. *PLoS One.* 2013;8(11):e80071. DOI:10.1371/journal.pone.0080071.

13. Jagadish N, Agarwal S, Gupta N, et al. Heat shock protein 70-2 (HSP70-2) overexpression in breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2016;35(1):150. DOI:10.1186/s13046-016-0425-9.

14. Jagadish N, Parashar D, Gupta N, et al. Heat shock protein 70-2 (HSP70-2) is a novel therapeutic target for colorectal cancer and is associated with tumor growth. *BMC Cancer.* 2016;16:561. DOI:10.1186/s12885-016-2592-7.

15. Kobayashi K, Matsushima-Nishiwaki R, Yamada N, et al. Heat shock protein 70 positively regulates transforming growth factor- α -induced hepatocellular carcinoma cell migration via the AKT signaling pathway. *Heliyon*. 2020;6(9):e05002. DOI:10.1016/j.heliyon.2020.e05002.
16. Liu CC, Jan YJ, Ko BS, et al. 14-3-3 σ induces heat shock protein 70 expression in hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer*. 2014;14:425. DOI:10.1186/1471-2407-14-425.
17. Bobkov D, Yudintceva N, Lomert E, et al. Lipid raft integrity is required for human leukemia Jurkat T-cell migratory activity. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2021;1866(6):158917. DOI:10.1016/j.bbalip.2021.158917.
18. Yudintceva N, Bobkov D, Sulatsky M, et al. Mesenchymal stem cells-derived extracellular vesicles for therapeutics of renal tuberculosis. *Sci Rep*. 2024;14(1):4495. DOI:10.1038/s41598-024-54992-z.
19. Ma B, Zhang K, Hendrie C, et al. PEAKS: powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2003;17(20):2337–2342. DOI:10.1002/rcm.1196.
20. Vostakolaei MA, Hatami-Baroogh L, Babaei G, et al. Hsp70 in cancer: A double agent in the battle between survival and death. *J Cell Physiol*. 2021;236(5):3420–3444. DOI:10.1002/jcp.30132.
21. Alhasan B, Gladova YA, Sverchinsky DV, et al. Hsp70 Negatively Regulates Autophagy via Governing AMPK Activation, and Dual Hsp70-Autophagy Inhibition Induces Synergetic Cell Death in NSCLC Cells. *Int J Mol Sci*. 2024;25(16):9090. DOI:10.3390/ijms25169090.
22. Tagaeva RB, Bobkov DE, Nechaeva AS, et al. Membrane-bound heat shock protein mHsp70 as a marker for malignant brain tumors. *Russian neurosurgical journal named after professor A. L. Polenov*. 2023;15(2):98–101. In Russian [Тагаева Р.Б., Бобков Д.Е., Нечаева А.С. и др. Мембранно-связанный белок теплового шока mHsp70 как маркер злокачественных опухолей головного мозга. *Российский нейрохирургический журнал им. проф. А. Л. Поленова*. 2023;15(2):98–101].
23. De P, Aske JC, Dey N. RAC1 Takes the Lead in Solid Tumors. *Cells*. 2019;8(5):382. DOI:10.3390/cells8050382.
24. Secli L, Fusella F, Avalle L, et al. The dark-side of the outside: how extracellular heat shock proteins promote cancer. *Cell Mol Life Sci*. 2021;78(9):4069–4083. DOI:10.1007/s00018-021-03764-3.
25. Sims JD, McCready J, Jay DG. Extracellular heat shock protein (Hsp)70 and Hsp90 α assist in matrix metalloproteinase-2 activation and breast cancer cell migration and invasion. *PLoS One*. 2011;6(4):e18848. DOI:10.1371/journal.pone.0018848.
26. Hunter MC, O'Hagan KL, Kenyon A, et al. Hsp90 binds directly to fibronectin (FN) and inhibition reduces the extracellular fibronectin matrix in breast cancer cells. *PLoS One*. 2014;9(1):e86842. DOI:10.1371/journal.pone.0086842.
27. McCready J, Sims JD, Chan D, et al. Secretion of extracellular hsp90 α via exosomes increases cancer cell motility: a role for plasminogen activation. *BMC Cancer*. 2010;10:294. DOI:10.1186/1471-2407-10-294.
28. McCready J, Wong DS, Burlison JA, et al. An Impermeant Ganetespib Analog Inhibits Extracellular Hsp90-Mediated Cancer Cell Migration that Involves Lysyl Oxidase 2-like Protein. *Cancers (Basel)*. 2014;6(2):1031–1046. DOI:10.3390/cancers6021031.
29. Amissah HA, Combs SE, Shevtsov M. Tumor Dormancy and Reactivation: The Role of Heat Shock Proteins. *Cells*. 2024;13(13):1087. DOI:10.3390/cells13131087.
30. Walsh N, Larkin A, Swan N, et al. RNAi knockdown of Hop (Hsp70/Hsp90 organising protein) decreases invasion via MMP-2 down regulation. *Cancer Lett*. 2011;306(2):180–189. DOI:10.1016/j.canlet.2011.03.004.

Информация об авторах:

Лихоманова Руслана Батыровна, младший научный сотрудник ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России; младший научный сотрудник ФГБУН «Институт цитологии РАН»;

Фофанов Георгий Константинович, студент Института медицинского образования ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Розанов Олег Павлович, студент Института медицинского образования ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Гараев Тимур Римович, студент Института медицинского образования ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Аксенов Николай Дмитриевич, к.х.н., старший научный сотрудник ФГБУН «Институт цитологии РАН»;

Зиганшин Рустам Хусманович, к.х.н., старший научный сотрудник ФГБУ «Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН»;

Юдинцева Наталия Михайловна, к.б.н., ведущий научный сотрудник ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России; ведущий научный сотрудник ФГБУН «Институт цитологии РАН»;

Бобков Данила Евгеньевич, к.б.н., старший научный сотрудник ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России; старший научный сотрудник ФГБУН «Институт цитологии РАН»;

Шевцов Максим Алексеевич, д.б.н., ведущий научный сотрудник ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России; ведущий научный сотрудник ФГБУН «Институт цитологии РАН».

Authors information:

Ruslana B. Likhomanova, junior researcher, Almazov National Medical Research Centre, Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences;

Georgii K. Fofanov, student, Almazov National Medical Research Centre;

Oleg P. Rozanov, student, Almazov National Medical Research Centre;

Timur R. Garaev, student, Almazov National Medical Research Centre;

Nikolay D. Aksenov, PhD, senior researcher, Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences;

Rustam Kh. Ziganshin, PhD, senior researcher, Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences;

Natalia M. Yudintceva, PhD, Leading Researcher, Almazov National Medical Research Centre; Leading Researcher, Institute of Cytology of The Russian Academy of Sciences;

Danila E. Bobkov, PhD, Senior Researcher, Almazov National Medical Research Centre; Senior Researcher, Institute of Cytology of The Russian Academy of Sciences;

Maxim A. Shevtsov, Phd, Dr.Sc.Biol., Leading Researcher, Almazov National Medical Research Centre; Leading Researcher, Institute of Cytology of The Russian Academy of Sciences.