

РОЛЬ ДВУХ ИЗОФОРМ БЕЛКА ТЕПЛОВОГО ШОКА Hsp90 В ОБЕСПЕЧЕНИИ УСТОЙЧИВОСТИ КЛЕТОК ФИБРОСАРКОМЫ ЧЕЛОВЕКА HT1080 К ИНГИБИТОРАМ HSP90 И ЦИТОТОКСИЧЕСКИМ ПРЕПАРАТАМ

© 2024 г. В.С. Петренко*,#, О.С. Моренков*, Ю.Ю. Скарга*,
М.А. Жмурина*, В.В. Врублевская*

**Институт биофизики клетки Российской академии наук — обособленное подразделение
ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»,
Институтская ул., 3, Пушкино Московской области, 142290, Россия*

#E-mail: 79182797935@yandex.ru

Поступила в редакцию 14.06.2024 г.

После доработки 14.06.2024 г.

Принята к публикации 03.07.2024 г.

Внутриклеточный белок теплового шока 90 (Hsp90) выполняет важные функции, связанные с укладкой, стабилизацией и деградацией различных белков в клетке, предотвращает агрегацию и денатурацию белков при различных видах стресса. Существуют две изоформы Hsp90, индуцибельная изоформа Hsp90 α и конститутивная изоформа Hsp90 β . Считается, что Hsp90 β играет ключевую роль в обеспечении функционирования белков «домашнего хозяйства», в то время как Hsp90 α играет важную роль в ответе клеток на стрессовые воздействия. Мы впервые исследовали роль двух изоформ Hsp90 в обеспечении устойчивости клеток фибросаркомы человека HT1080 к ингибиторам Hsp90 и ряду противоопухолевых препаратов с разным механизмом действия. Показано, что обе изоформы Hsp90 вносят сопоставимый вклад в устойчивость клеток к ингибиторам Hsp90 и одна изоформа Hsp90 не способна полностью скомпенсировать отсутствие другой изоформы Hsp90 при действии ингибиторов Hsp90. В обеспечении устойчивости клеток к цитотоксическим противоопухолевым препаратам также участвуют обе изоформы Hsp90, при этом Hsp90 α , вероятно, играет более важную роль, чем Hsp90 β , в обеспечении защиты клеток от цитотоксического действия сорафениба и нокадазола. В случае цисплатина каждая из изоформ Hsp90 способна в значительной степени скомпенсировать отсутствие другой изоформы. В случае доксорубина, бортезомиба, сорафениба, паклитакселя и нокадазола отсутствие одной из изоформ Hsp90 приводило к существенному снижению устойчивости клеток к противоопухолевым препаратам, особенно резко выраженному в случае паклитакселя и нокадазола. Ингибитор Hsp90 17-(аллиламино)гелданамицин потенцирует действие цитотоксических препаратов на клетки, обеспечивая наиболее выраженный синергизм с паклитакселем и нокадазолом. В результате впервые определена важная роль обеих изоформ Hsp90 в обеспечении устойчивости клеток к ингибиторам Hsp90 и противоопухолевым препаратам с различными механизмами действия. Полученные данные свидетельствуют о перспективности разработки Hsp90 α - или Hsp90 β -специфических ингибиторов для противоопухолевой терапии и их комбинированном применении с известными противоопухолевыми препаратами.

Ключевые слова: белки теплового шока Hsp90 α и Hsp90 β , ингибиторы Hsp90, цитотоксические препараты.

DOI: 10.31857/S0006302924060086, **EDN:** NLKMWQ

Белок теплового шока 90 (Hsp90) является консервативным молекулярным шапероном, обеспечивающим фолдинг внутриклеточных бел-

ков и участвующим в регуляции их активности и деградации [1, 2]. Мономер Hsp90 состоит из трех консервативных доменов — N-терминального домена, среднего домена и C-концевого домена; между N-терминальным доменом и средним доменом располагается заряженная линкерная область. N-терминальный домен обеспечивает связывание Hsp90 с АТФ, что является необходимым

Сокращения: Hsp90 — белок теплового шока 90, 17-AAG — 17-(аллиламино)гелданамицин, Hsp90 α -КО и Hsp90 β -КО — мутантные клеточные линии, не экспрессирующие Hsp90 α и Hsp90 β соответственно.

условием функционирования Hsp90. Средний домен содержит сайты связывания для клиентских белков и ко-шаперонов, а С-концевой домен опосредует гомодимеризацию Hsp90 и содержит нуклеотид-связывающий домен, который аллостерически регулирует АТФазную активность N-терминального домена [1, 3–5]. К настоящему времени выявлено более 700 белков-клиентов Hsp90, участвующих во внутриклеточной сигнализации, репарации ДНК, активации и транспортировке рецепторов и т.д. [1, 2, 6]. В этой связи Hsp90 играет важную роль во многих клеточных процессах, включая поддержание клеточного гомеостаза, ремоделирование цитоскелета, выживание и дифференцировку клеток, пролиферацию, миграцию клеток и т.д. [1–3, 7]. Среди белков-клиентов Hsp90 найдено множество онкобелков, включая, например, опухоль-ассоциированные киназы (RAF-1, HER2 и т.д.), сигнальные белки (Akt и SRC), факторы транскрипции (p53, stat3, HIF-1), экспрессия которых напрямую связана с пролиферацией и импортизацией раковых клеток [1–3, 7, 8]. Hsp90, концентрация которого в опухолевых клетках увеличена в 2–10 раз в сравнении с нормальными клетками, способствует конформационному созреванию онкобелков и препятствует их деградации [7–9]. Ингибирование Hsp90 приводит к неправильному «созреванию» и деградации белков-клиентов Hsp90, что, в конечном счете, заканчивается гибелью опухолевых клеток [8, 10–13]. С учетом важной роли Hsp90 в функционировании опухолевых клеток, Hsp90 считается перспективной молекулярной мишенью для разработки противоопухолевых препаратов [10–13]. Ингибиторы Hsp90 имеют ряд преимуществ по сравнению с другими противоопухолевыми препаратами, поскольку большое количество клиентских белков Hsp90 являются белками, участвующими во внутриклеточной сигнализации, и ингибиторы Hsp90 действуют одновременно на многочисленные сигнальные пути, подавляя функционирование опухолевых клеток. Поэтому анти-Hsp90-терапия с меньшей вероятностью приведет к выживанию опухолевых клеток, чем терапия, направленная только на одну мишень.

К настоящему времени разработаны ингибиторы Hsp90 различного типа. Большинство ингибиторов специфичны к N-терминальному домену и препятствуют его взаимодействию с АТФ [10–13]. Первым описанным ингибитором Hsp90 был гелданамицин, природное соединение, выделенное из *Streptomyces hygroscopicus* и относящееся к группе бензохиноновых анасаминов [11–14]. Недостатком гелданамицина является его низкая стабильность и высокая гепатотоксичность [15]. На основе гелданамицина были разработаны структурно близкие ингибиторы нового поколения — 17-(аллиламино)гелданамицин (17-AAG),

17-DMAG, 17-AAGH2 и др. [11–16], которые характеризуются сниженной гепатотоксичностью и улучшенной растворимостью по сравнению с гелданамицином, что делает их более предпочтительными для использования *in vivo* [14–17]. Разработаны ингибиторы N-терминального домена Hsp90 пуринового ряда (например, ВПВ021, ВПВ028 и др.), резозиновые ингибиторы (ганетеспиб, люминеспиб и др.) [10, 18, 19]. Созданы ингибиторы, специфичные к С-терминальному домену Hsp90 (новобиоцин, KU-174), в также к среднему домену Hsp90 (San A, H-10, H-15), которые также эффективно ингибируют шаперонный цикл Hsp90 [13, 14, 20]. Ингибиторы Hsp90 продемонстрировали выраженный антипролиферативный эффект по отношению к разным типам раковых клеток, что обуславливает их изучение как в качестве монотерапии, так и в комбинации с уже известными противоопухолевыми цитостатиками [21, 25–27]. Установлено, что ингибиторы Hsp90 демонстрируют аддитивный или синергетический эффект в подавлении роста опухолевых клеток в сочетании с такими цитотоксическими препаратами, используемыми для лечения рака, как таксаны, цисплатин, ингибиторы протеасом и др. [10, 21–24]. Например, 17-ААГ и гелданамицин сенсibilizировали клетки рака легких и молочной железы к индуцированной паклитакселем цитотоксичности *in vitro* и *in vivo* [21–23]. В комбинации 17-ААГ и цисплатина синергетическая противоопухолевая активность наблюдалась по отношению к раку толстой кишки и некоторых солидных опухолей [24, 25]. Комбинированная терапия с использованием ингибиторов Hsp90 и различных цитостатиков неоднократно демонстрировала более эффективное антипролиферативное воздействие на раковые клетки *in vitro* и *in vivo* [21–25]. Проводятся доклинические и клинические исследования различных ингибиторов Hsp90 для терапии рака [24–27]. Основным недостатком ингибиторов Hsp90 является их токсичность для клеток и организмов [15, 25–27].

Существуют две изоформы цитоплазматического Hsp90, стресс-индуцибельная изоформа Hsp90 α и конститутивная изоформа Hsp90 β [1, 3, 6, 7]. Уровень гомологии Hsp90 α и Hsp90 β составляет ~86% [6, 7], что обуславливает их схожесть в функциональном плане. Экспрессия Hsp90 α увеличивается в ответ на стрессовые воздействия и считается, что эта изоформа Hsp90 участвует в адаптации клеток к стрессу [5, 28]. Hsp90 β синтезируется конститутивно и участвует в фолдинге белков «домашнего хозяйства», обеспечивая жизнеспособность клеток [3, 5, 28]. К настоящему времени не созданы эффективные ингибиторы, строго селективные к отдельным изоформам Hsp90. Разработка таких ингибиторов, с учетом высокого уровня гомологии Hsp90 α и Hsp90 β , является нетривиальной задачей. Изоформа-специ-

фические Hsp90 ингибиторы могут быть менее токсичными, т.к. они не будут подавлять другую изоформу Hsp90, что обеспечит выживаемость клеток. При этом изоформа-специфические ингибиторы могут ингибировать сигнальные пути, вовлеченные в онкогенез. Для оценки перспективности разработки такого типа ингибиторов Hsp90 необходимо понимание роли отдельных изоформ Hsp90 в обеспечении выживаемости клеток в ответ на действие ингибиторов Hsp90 и противоопухолевых препаратов. Ранее мы создали клеточные линии фибросаркомы человека HT1080 с нокаутом гена *HSP90AA1*, кодирующего Hsp90 α -изоформу, и линии с нокаутом гена *HSP90AB1*, кодирующего Hsp90 β -изоформу [29]. В данном исследовании с использованием созданных нокаутных клеточных линий мы исследовали роль двух изоформ Hsp90 в обеспечении устойчивости клеток к различным ингибиторам Hsp90, цитотоксическим противоопухолевым препаратам и при комбинированном действии ингибиторов Hsp90 и цитостатиков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Линия клеток фибросаркомы человека HT1080 была получена из Коллекции клеточных культур позвоночных (ИНЦ РАН, Санкт-Петербург, Россия). Получение линий клеток HT1080 с нокаутированным геном *HSP90AA1*, кодирующим Hsp90 α , и нокаутированным геном *HSP90AB1*, кодирующим Hsp90 β , описано ранее [29]. Вкратце, для индель-мутагенеза первого экзона генов *HSP90AA1* и *HSP90AB1* использовали плазмидные конструкции на основе никазного вектора All-in-One (AIO-GFP, Addgene 74119). Никазный вектор AIO-GFP применяли с целью снижения возможного мутагенеза в нецелевых областях (off-target) генома [30]. Успешный нокаут генов *HSP90AA1* и *HSP90AB1* в полученных клонах был подтвержден методом иммуноблоттинга и проточной цитометрии с использованием специфических антител. Биаллельность мутаций генов в Hsp90 α - и Hsp90 β -негативных клонах доказана посредством секвенирования целевых участков генов *HSP90AA1* и *HSP90AB1*. Мутации приводили к сдвигу рамки считывания и сопровождалась остановкой синтеза соответствующих белков. В результате были отобраны три клеточные линии с нокаутом гена *HSP90AA1* (Hsp90 α -КО, линии 5C3/7D5, 2C8/7F10 и 1C7) и три клеточные линии с нокаутом гена *HSP90AB1* (Hsp90 β -КО, линии 6D6/3D8, 3E5/2F8/3B9 и 1G3) [29]. Схематическое представление локализации и характера мутаций в генах *HSP90AA1* и *HSP90AB1* линий Hsp90 α -КО и Hsp90 β -КО приведено на рис. 1.

Исходную культуру HT1080 и мутантные клеточные линии Hsp90 α -КО и Hsp90 β -КО куль-

тивировали в среде ДМЕМ (среда Игла в модификации Дульбекко), содержащей 10% сыворотки эмбрионов коров (ЭБС) и антибиотики пенициллин/стрептомицин (ДМЕМ-ЭБС). Пересев клеток осуществляли посредством трипсинизации через 2–3 дня, не допуская перерастания клеток.

В работе использовали ингибиторы Hsp90: гелданамицин, 17-AAG, ганетеспиб и ВПВ021, а также цитотоксические противоопухолевые препараты нокадазол, доксорубин, бортезомиб, паклитаксел, цисплатин и сорафениб. Ингибиторы Hsp90 и цитотоксические препараты растворяли в диметилсульфоксиде до концентрации 1–2 мг/мл и хранили при температуре -80°C . Для оценки чувствительности клеток к ингибиторам Hsp90 и цитотоксическим препаратам мутантные клеточные линии Hsp90 α -КО и Hsp90 β -КО и исходную культуру HT1080 (контроль) ресуспендировали в среде ДМЕМ-ЭБС, высевали в лунки 96-луночного культурального планшета (Fudau, Китай) с плотностью $1.5 \cdot 10^5$ клеток в лунке и инкубировали в течение 24 ч в атмосфере 5% CO_2 при 37°C . К экспоненциально растущим клеткам (50–60% монослоя) добавляли соответствующие ингибиторы Hsp90 или цитотоксические препараты в разных концентрациях, либо же их комбинации. В качестве контроля использовали клетки без обработки ингибиторами/цитостатиками с добавлением 0.5–1.0% диметилсульфоксида. Клетки инкубировали в течение 48 ч в атмосфере 5% CO_2 при 37°C . После этого к клеткам в культуральную среду добавляли 3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-тетразолий бромид (МТТ-реагент) до конечной концентрации 1 мг/мл и инкубировали в течение 2 ч при 37°C . Затем среду удаляли, образовавшиеся кристаллы формазана растворяли в диметилсульфоксиде и измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 570 нм (OP_{570}) с помощью планшетного ридера iMax (Bio-Rad, США). Для каждой клеточной линии и каждого варианта обработки ингибитором/цитостатиком использовали три-пять независимых повторов. Каждый эксперимент повторяли три-шесть раз. Результаты выражали как средние значения $OP_{570} \pm$ стандартное отклонение. Исходя из полученных результатов рассчитывали концентрацию ингибиторов/цитостатиков, обеспечивающую гибель 50% клеток (IC_{50}). Статистический анализ проводили с помощью программного обеспечения SigmaPlot 13.0 (Systat Software Inc., США). Результаты отдельных экспериментов представлены на рисунках.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки влияния различных ингибиторов Hsp90 на исходную клеточную линию HT1080 и

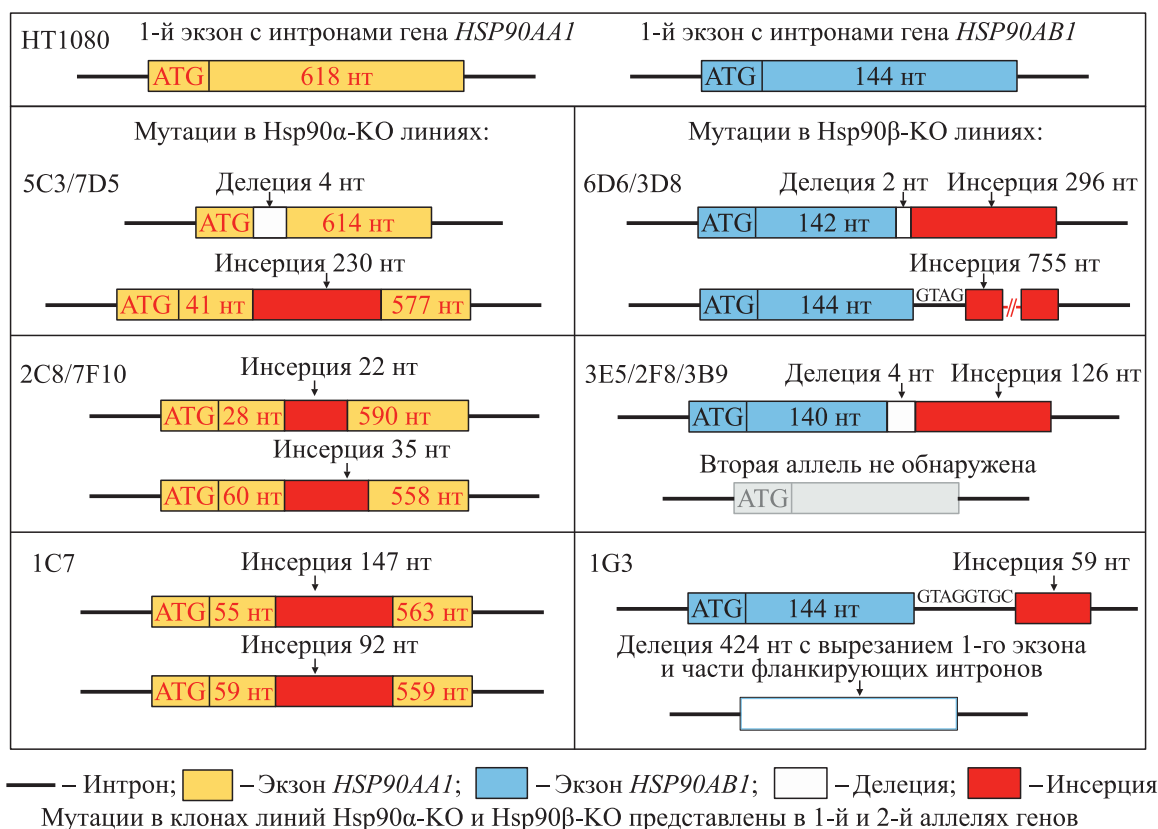
Создание клонов клеток HT1080 с нокаутированным геном *HSP90AA1* и *HSP90AB1*

Рис. 1. Схематическое представление локализации и характера мутаций в двух аллелях генов *HSP90AA1* и *HSP90AB1* клеточных линий Hsp90α-КО и Hsp90β-КО.

мутантные клеточные линии Hsp90α-КО и Hsp90β-КО клетки инкубировали в присутствии ингибиторов Hsp90 в различных концентрациях в течение 48 ч и далее оценивали относительное количество жизнеспособных клеток с помощью МТТ-метода. Чувствительность клеток к ингибиторам Hsp90 рассчитывали по величине IC_{50} : чем больше величина IC_{50} , тем выше чувствительность клеток к ингибитору. Все ингибиторы Hsp90 дозозависимым образом оказывали цитотоксическое действие на клетки (рис. 2). Все мутантные клеточные линии Hsp90α-КО и Hsp90β-КО были более чувствительны к ингибиторам Hsp90 в сравнении с исходной линией HT1080; разница между HT1080 и мутантными линиями по чувствительности к гелданамицину, 17-AAG и ганетеспибу, рассчитанная по величине IC_{50} , составляла 2–3 раза. При обработке клеток гелданамицином, 17-AAG или ганетеспибом мутантные линии Hsp90α-КО и Hsp90β-КО продемонстрировали примерно одинаковую чувствительность к цитотоксическим препаратам (рис. 2а–е). Наиболее выраженная разница между HT1080 и мутантными линиями наблюдалась при обработке клеток ВПВ021: IC_{50} для HT1080 составляла 2 мкМ

ВПВ021, для мутантных линий — при 200–500 нМ (рис. 2ж,з). При обработке клеток ингибитором ВПВ021, отсутствие Hsp90α в клетках (линии Hsp90α-КО) было более критично, чем отсутствие Hsp90β (линии Hsp90β-КО). В целом, полученные результаты свидетельствовали, что обе изоформы Hsp90 вносят вклад в устойчивость клеток к ингибиторам Hsp90 и что вклад Hsp90α и Hsp90β в устойчивость клеток к этим ингибиторам сопоставим. Одна изоформа Hsp90 не способна полностью компенсировать отсутствие другой изоформы. При этом следует учитывать, что при нокауте гена, кодирующего одну из изоформ Hsp90, содержание второй изоформы в клетках увеличивается в 1.2–1.5 раза [29], что частично нивелирует потерю одной из изоформ цитоплазматического Hsp90.

К настоящему времени роль Hsp90α и Hsp90β в обеспечении устойчивости клеток к цитотоксическим препаратам, используемым в онкологии, не исследована. Мы оценили чувствительность клеток HT1080, а также нокаутных линий Hsp90α-КО и Hsp90β-КО, к цитотоксическим препаратам цисплатину, доксорубину, бортезомибу, сорафенибу, паклитакселю и нокодазо-

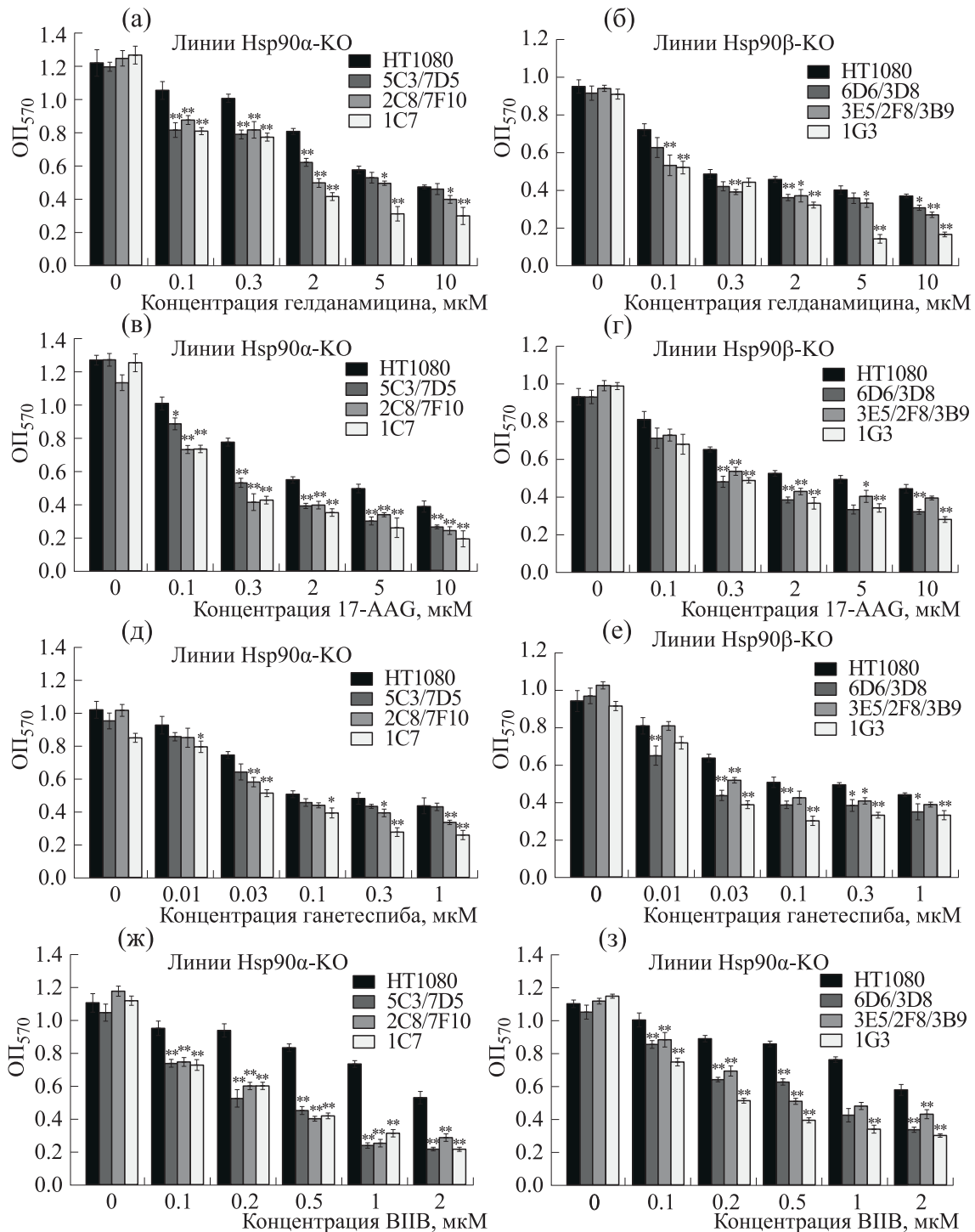


Рис. 2. Влияние Hsp90-специфичных ингибиторов на клетки линий Hsp90α-KO и Hsp90β-KO, не экспрессирующих соответственно Hsp90α или Hsp90β. Клетки обрабатывали гелданамицином (а, б), 17-AAG (в, г), ганетеспибом (д, е) и ВПВ021 (ж, з) в разных концентрациях. Каждая точка представляет собой среднее арифметическое значение $OP_{570} \pm SD$ ($n = 4-5$). Звездочками отмечены статистически достоверные отличия от контрольных клеток HT1080, обработанных сходным образом: * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$.

лу, обладающими разными механизмами цитотоксического действия. Цисплатин является платиносодержащим алкилирующим соединением,

которое, связываясь с пуриновыми основаниями гуанином и аденином, приводит к внутрипочечным и межпочечным сшивкам, вызываю-

Таблица 1. Чувствительность клеток HT1080 и клеток мутантных линий Hsp90 α -KO и Hsp90 β -KO к цитотоксическим препаратам в отсутствие и в присутствии 100 нМ ингибитора Hsp90 17-AAG

Препарат		50%-я ингибирующая концентрация цитотоксического препарата (IC_{50}), мкМ						
		HT1080	Hsp90 α -KO			Hsp90 β -KO		
			5C3/7D5	2C8/7F10	1C7	6D6/3D8	3E5/2F8/3B9	1G3
Цисплатин	—	4.60 \pm 0.38	5.50 \pm 0.43	5.70 \pm 0.41	7.20 \pm 0.51	4.20 \pm 0.38	3.90 \pm 0.42	3.80 \pm 0.33
	17-AAG	4.20 \pm 0.60	4.00 \pm 0.49	4.80 \pm 0.55	4.90 \pm 0.54	3.40 \pm 0.38	1.60 \pm 0.33	2.30 \pm 0.29
Доксорубин	—	0.22 \pm 0.02	0.14 \pm 0.02	0.13 \pm 0.02	0.14 \pm 0.03	0.17 \pm 0.04	0.16 \pm 0.04	0.15 \pm 0.03
	17-AAG	0.16 \pm 0.03	0.05 \pm 0.02	0.06 \pm 0.02	0.05 \pm 0.03	0.08 \pm 0.03	0.09 \pm 0.03	0.08 \pm 0.04
Бортезомиб	—	0.020 \pm 0.006	0.015 \pm 0.002	0.010 \pm 0.002	0.015 \pm 0.003	0.008 \pm 0.002	0.010 \pm 0.002	0.01 \pm 0.003
	17-AAG	0.010 \pm 0.003	0.007 \pm 0.001	0.005 \pm 0.001	0.005 \pm 0.001	0.005 \pm 0.001	0.005 \pm 0.002	0.007 \pm 0.002
Сорафениб	—	4.40 \pm 0.55	3.20 \pm 0.33	3.40 \pm 0.36	2.20 \pm 0.29	4.80 \pm 0.37	6.1 \pm 1.1	4.3 \pm 0.5
	17-AAG	2.30 \pm 0.35	1.00 \pm 0.18	1.90 \pm 0.20	2.00 \pm 0.03	1.50 \pm 0.41	2.30 \pm 0.37	1.80 \pm 0.35
Паклитаксел	—	3.15 \pm 0.25	1.90 \pm 0.31	0.51 \pm 0.05	0.43 \pm 0.04	0.42 \pm 0.04	0.33 \pm 0.03	0.22 \pm 0.02
	17-AAG	0.35 \pm 0.04	0.08 \pm 0.01	0.12 \pm 0.02	0.11 \pm 0.02	0.08 \pm 0.01	0.09 \pm 0.02	0.08 \pm 0.01
Нокодазол	—	15.7 \pm 2.7	1.30 \pm 0.21	0.77 \pm 0.11	0.65 \pm 0.08	2.90 \pm 0.33	4.70 \pm 0.53	2.30 \pm 0.04
	17-AAG	1.40 \pm 0.25	0.09 \pm 0.02	0.13 \pm 0.03	0.14 \pm 0.02	0.08 \pm 0.02	0.09 \pm 0.01	0.17 \pm 0.03

Примечание. Каждая точка представляет собой среднее значение $\pm SD$ ($n = 4-5$).

щим последующие разрывы нитей ДНК и, как следствие, нарушение транскрипции и репликации ДНК, задержку клеточного цикла и апоптоз клеток [31]. Доксорубин, относящийся к антрациклиновым антибиотикам, обладает сложным механизмом действия, включающим повреждение ДНК посредством интеркаляции, взаимодействие с топоизомеразой II и связывание с липидами клеточных мембран, что приводит к выработке активных форм кислорода, апоптозу, аутофагии, ферроптозу и пироптозу [32]. Бортезомиб является модифицированной борной кислотой, связывается с каталитическим сайтом 26S протеасомы и ингибирует протеасома-зависимую деградацию проапоптотических факторов, тем самым запуская запрограммированную гибель опухолевых клеток [33]. Сорафениб является мультитикинным ингибитором, блокирующим RAF/MEK/ERK сигнальный путь в опухолевых клетках и ингибирующим ангиогенез путем по-

давления передачи сигналов VEGFR и PDGFR в сосудистой сети опухоли [34]. Паклитаксел (таксол), относящийся к таксанам, стабилизирует микротрубочки за счёт ингибирования их деполимеризации, что приводит к остановке клеточного цикла на митотической фазе и является причиной его цитотоксичности [35]. Нокодазол тоже влияет на динамику сборки/разборки микротрубочек, связывается в клетках с β -тубулином и препятствует полимеризации микротрубочек, что блокирует митоз и индуцирует апоптоз в опухолевых клетках [36]. Обобщенные результаты оценки токсичности различных противоопухолевых препаратов на клетки HT1080 и мутантные клеточные линии Hsp90 α -KO и Hsp90 β -KO представлены в табл. 1.

Отсутствие Hsp90 α и Hsp90 β в клетках незначительно влияло на чувствительность клеток к цисплатину. К доксорубину и бортезомибу му-

тантные линии были несколько более чувствительны, в сравнении с исходной линией HT1080: IC_{50} для линий Hsp90 α -КО и Hsp90 β -КО для этих ингибиторов были снижены в 1.5–2.0 раза, в сравнении с HT1080. В сравнении с HT1080, клеточные линии Hsp90 α -КО были в 1.5–2.0 раза чувствительнее в сорафенибу, однако чувствительность Hsp90 β -негативных линий к цитотоксическому препарату была сопоставима с чувствительностью клеток HT1080. Более того, клеточная линия 3E5/2F8/3B9, не экспрессирующая Hsp90b, проявляла более высокую устойчивость к сорафенибу в сравнении с клетками HT1080. Потеря клетками одной из изоформ Hsp90 очень резко повышала их чувствительность к паклитакселю и нокодазолу. Чувствительность Hsp90 α -КО клеточных линий 2C8/7F10 и 1C7 к паклитакселю, рассчитанная по IC_{50} , была в 6–8 раз выше, чем клеток HT1080, однако чувствительность к паклитакселю Hsp90 α -негативной линии 5C3/7D5 и HT1080 были сопоставимы. Чувствительность всех трех клеточных линий Hsp90b-КО к паклитакселю была в 7–15 раз выше, чем клеток HT1080. При обработке клеток нокодазолом IC_{50} для клеток линий Hsp90 α -КО была в 10–25 раз ниже, а для клеточных линий Hsp90b-КО – в 3–7 раз ниже в сравнении с клетками HT1080.

В целом, полученные результаты свидетельствовали, что в случае цисплатина каждая из изоформ Hsp90 была способна в значительной степени скомпенсировать отсутствие другой изоформы в обеспечении фолдинга/активности белков, задействованных в механизмах устойчивости к цисплатину. Для остальных цитотоксических препаратов обе изоформы Hsp90 вносили сопоставимый вклад в обеспечение устойчивости клеток к их цитотоксическому действию. При этом каждая из изоформ Hsp90 не способна полностью скомпенсировать отсутствие другой изоформы Hsp90 в клетке при действии доксорубина, бортезомиба, сорафениба, паклитакселя и нокодазола, что приводит к существенному повышению чувствительности клеток к отсутствию Hsp90 α или Hsp90 β в клетках Hsp90 α -КО и Hsp90 β -КО. Hsp90 α , вероятно, играет более важную роль, чем Hsp90 β , в обеспечении защиты клеток от цитотоксического действия сорафениба, так как утрата клетками Hsp90 β незначительно влияла на их устойчивость к этому препарату. Снижение устойчивости клеток к доксорубину, бортезомибу и сорафенибу у Hsp90 α -КО и Hsp90 β -КО было не очень значительным и в определенной степени коррелировало с суммарным содержанием Hsp90 в мутантных клетках, для которых характерно повышенное содержание оставшейся изоформы Hsp90 после нокаута другой изоформы Hsp90 [29]. Другая картина наблюдалась при обработке клеток паклитакселем и но-

кодазолом. Отсутствие в клетках Hsp90 α или Hsp90 β сопровождалась резким повышением чувствительности клеток к этим цитотоксическим препаратам: каждая из изоформ Hsp90 была не способна скомпенсировать отсутствие другой изоформы Hsp90 в клетке при действии этих цитотоксических препаратов. Hsp90 α , вероятно, играет более важную роль, чем Hsp90 β в обеспечении защиты клеток от цитотоксического действия нокодазола. Возможно, что в механизмах устойчивости клеток к паклитакселю и нокодазолу участвуют белки, функционирование которых критически зависит от Hsp90 α или от Hsp90 β . Иначе говоря, сохраняющаяся вторая изоформа Hsp90 обладает ограниченной возможностью заменить другую изоформу Hsp90. Интересно, что механизмы действия паклитакселя и нокодазола хоть и отличаются, однако связаны с дестабилизацией динамики сборки/разборки микротрубочек – ключевого компонента цитоскелета клеток [35, 36].

Далее мы оценили синергизм цитотоксических препаратов и ингибиторов Hsp90 на клетках HT1080 и мутантных линиях клеток Hsp90 α -КО и Hsp90 β -КО. Для этого оценивали действие цитотоксических препаратов в комбинации с ингибитором Hsp90 17-AAG в невысокой концентрации – 100 нм. 17-AAG в этой концентрации практически не влиял на жизнеспособность клеток HT1080 (~90% жизнеспособных клеток) и незначительно снижал жизнеспособность клеток Hsp90 α -КО и Hsp90 β -КО (от 90 до 75% жизнеспособных клеток). Комбинированное воздействие 17-AAG и цисплатина незначительно повышало чувствительность клеток исходной линии HT1080 и мутантных линий к цисплатину, свидетельствуя о слабом синергическом эффекте 17-AAG и цисплатина. Чувствительность клеток HT1080, а также клеток мутантных линий Hsp90 α -КО и Hsp90 β -КО к доксорубину, бортезомибу и сорафенибу повышалась в 1.5–3.0 раза в присутствии 17-AAG, что свидетельствовало об определенном уровне синергизма 17-AAG и этих цитотоксических препаратов в проявлении цитотоксического эффекта при обработке клеток. Гораздо больший синергический эффект наблюдался при комбинированной обработке клеток 17-AAG и паклитакселем или нокодазолом. В присутствии 17-AAG величина IC_{50} для паклитакселя снижалась в 7–9 раз для исходной линии HT1080 и в 3–4 раза – для всех линий клеток Hsp90 α -КО и Hsp90 β -КО; при этом IC_{50} для мутантных клеток была в 3–5 раз ниже, в сравнении с клетками HT1080. При комбинированном воздействии нокодазола и 17-AAG чувствительность к нокодазолу повышалась примерно в 15 раз для клеток HT1080, в 5–15 раз – для разных линий клеток Hsp90 α -КО и в 15–50 раз – для разных ли-

ний клеток Hsp90 β -КО. При этом при сочетанном воздействии 17-ААГ и нокадазола IC₅₀ для мутантных клеток была в 8–15 раз ниже в сравнении с клетками HT1080. В целом, на клетках HT1080 и на мутантных линиях наблюдалось синергическое действие всех исследованных цитотоксических препаратов с 17-ААГ, ингибитором Hsp90. Особенно выраженный синергический эффект регистрировался при комбинированном воздействии 17-ААГ с нокадазолом и с паклитакселем; для исходной линии HT1080 это согласуется с ранее полученными данными [21, 22, 37].

В данной работе мы показали, что отсутствие одной из изоформ Hsp90 повышает цитотоксическое действие ряда противоопухолевых препаратов, в особенности паклитакселя и нокадазола. Более того, ингибитор Hsp90 17-ААГ в невысокой концентрации проявляет выраженный синергизм с цитотоксическими противоопухолевыми препаратами при воздействии на исходные клетки HT1080 и мутантные линии. Рассматривая клетки Hsp90 α -КО и Hsp90 β -КО, у которых отсутствует синтез Hsp90 α или Hsp90 β , в качестве модели фармакологического подавления одной из изоформ Hsp90, полученные нами данные свидетельствуют о перспективности разработки Hsp90 α - или Hsp90 β -специфических ингибиторов для противоопухолевой терапии. Hsp90 α - или Hsp90 β -специфические ингибиторы, вероятно, не будут обладать значительной токсичностью для организма, так как отсутствие отдельно Hsp90 α или Hsp90 β незначительно сказывается на жизнеспособности клеток [29]. Полученные нами данные о крайне высокой чувствительности Hsp90 α - или Hsp90 β -негативных клеток к цитотоксическим препаратам, в особенности к паклитакселю и нокадазолу, позволяют предположить, что применение Hsp90 α - или Hsp90 β -специфических ингибиторов может позволить существенно снизить дозы противоопухолевых препаратов с сохранением терапевтического эффекта. Незначительное ингибирование оставшейся функционально активной изоформы Hsp90 низкими дозами ингибиторов Hsp90 может позволить дополнительно снизить эффективные дозы противоопухолевых препаратов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обе изоформы Hsp90, Hsp90 α и Hsp90 β , вносят вклад в устойчивость клеток к ингибиторам Hsp90 и цитотоксическим противоопухолевым препаратам. При этом одна изоформа Hsp90 не способна полностью скомпенсировать отсутствие другой изоформы при действии ингибиторов Hsp90 и противоопухолевых препаратов, в особенности паклитакселя и нокадазола. Показан синергизм действия ингибитора Hsp90 17-

ААГ с цитотоксическими препаратами, особенно выраженный при обработке клеток паклитакселем и нокадазолом. Полученные данные свидетельствуют о перспективности разработки Hsp90 α - или Hsp90 β -специфических ингибиторов для использования в комбинированной противоопухолевой терапии.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с изложенными в статье данными.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания собственных исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Biebl M. M. and Buchner J. Structure, function, and regulation of the Hsp90 machinery. *Perspect. Biol.*, **11** (9), a034017 (2019). DOI: 10.1101/cshperspect.a034017
2. Neckers L., Mollapour M., and Tsutsumi S. The complex dance of the molecular chaperone Hsp90. *Trends Biochem. Sci.*, **34**, 223 (2009). DOI: 10.1016/j.tibs.2009.01.006
3. Maiti S. and Picard D. Cytosolic Hsp90 isoform-specific functions and clinical significance. *Biomolecules*, **12**, 1166 (2022). DOI: 10.3390/biom12091166
4. Wandinger S. K., Richter K., and Buchner J. The Hsp90 chaperone machinery. *J. Biol. Chem.*, **283**, 18473 (2008). DOI: 10.1038/nrm.2017.20
5. Prodromou C. The 'active life' of Hsp90 complexes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1823**, 614 (2012). DOI: 10.1016/j.bbamer.2011.07.020
6. Zuehlke A. D., Beebe R., Neckers L., and Prince T. Regulation and function of the human HSP90AA1 gene. *Gene*, **570**, 8 (2015). DOI: 10.1016/j.gene.2015.06.018
7. Hoter A., El-Sabban M. E., and Naim H. Y. The HSP90 family: Structure, regulation, function, and implications in health and disease. *Int. J. Mol. Sci.*, **19** (9), 2560 (2018). DOI: 10.3390/ijms19092560
8. Pick E., Kluger Y., Giltane J. M., Moeder C., Camp R. L., Rimm D. L., and Kluger H. M. High HSP90 expression is associated with decreased survival in breast cancer. *Cancer Res.*, **67**, 2932 (2007).
9. Ciocca D. R., Arrigo A. P., and Calderwood S. K. Heat shock proteins and heat shock factor 1 in carcinogenesis and tumor development: An update. *Arch. Toxicol.*, **87**, 19 (2013). DOI: 10.1007/s00204-012-0918-z
10. Dernovsek J. and Tomasic T. Following the design path of isoform-selective Hsp90 inhibitors: Small differences, great opportunities. *Pharmacol. Ther.*, **245**, 108396 (2023). DOI: 10.1016/j.pharmthera.2023.108396

11. Sanchez J., Carter T. R., Cohen M. S., and Blagg B. S. Old and new approaches to target the Hsp90 chaperone. *Curr. Cancer Drug Targets.*, **20** (4), 253 (2020). DOI: 10.2174/1568009619666191202101330
12. Miyata Y., Nakamoto H., and Neckers L. The therapeutic target Hsp90 and cancer hallmarks. *Curr. Pharm. Des.*, **19** (3), 347 (2013). DOI: 10.2174/138161213804143725
13. Neckers L., Blagg B., Haystead T., Trepel J. B., Whitesell L., and Picard D. Methods to validate Hsp90 inhibitor specificity, to identify off-target effects, and to re-think approaches for further clinical development. *Cell Stress & Chaperones.*, **23** (4), 467 (2018). DOI: 10.1007/s12192-018-0877-2
14. Park S., Park J. A., Jeon J. Y., and Lee Y. Traditional and novel mechanisms of heat shock protein 90 (HSP90) Inhibition in cancer chemotherapy including HSP90 cleavage. *Biomol. Ther.*, **27** (5), 423 (2019). DOI: 10.4062/biomolther.2019.051
15. Gorska M. and Popowska U. Geldanamycin and its derivatives as Hsp90 inhibitors. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)*, **17** (6), 2269 (2012). DOI: 10.2741/4050
16. Saad Z. U., Robert B., and Zihai L. 17 AAG for HSP90 inhibition in cancer – from bench to bedside. *Curr. Mol. Med.*, **9** (5), 654 (2009). DOI: 10.2174/156652409788488757
17. Taiyab A., Srinivas U. K., and Sreedhar A. S. 17-(Allyl-amino)-17-demethoxygeldanamycin combination with diferuloylmethane selectively targets mitogen kinase pathway in a human neuroblastoma cell line. *J. Cancer Ther.*, **1**, 197 (2010). DOI: 10.4236/jct.2010.14031
18. Biamonte M. A., Water R. V., Arndt J. W., Scannevin R. H., Perret D., and Lee W. Heat shock protein 90: Inhibitors in clinical trials. *J. Med. Chem.*, **53** (1), 3 (2010). DOI: 10.1021/jm9004708
19. Hong D., Said R., Falchook G., Naing A., Moulder S., Tsimberidou A., Galluppi G., Dakappagari N., Storgard C., Kurzrock R., and Rosen L.S. Phase I study of BIIB028, a selective heat shock protein 90 inhibitor, in patients with refractory metastatic or locally advanced solid tumors. *Clin. Cancer Res.*, **19** (17), 4824 (2013). DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0477
20. Soti C., Racz A., and Csermely P. A nucleotide-dependent molecular switch controls ATP binding at the C-terminal domain of Hsp90. N-terminal nucleotide binding unmasks a C-terminal binding pocket. *J. Biol. Chem.*, **277** (9), 7066 (2002). DOI: 10.1074/jbc.M105568200
21. Berko Y. A., Funmilola A. F., and Akala E. O. Fabrication of paclitaxel and 17AAG-loaded poly-ε-caprolactone nanoparticles for breast cancer treatment. *J. Pharm. Drug Deliv. Res.*, **10** (1), 196 (2021). DOI: 10.48047/ecb/2023.12.s14.1190
22. Katragadda U., Fan W., Wang Y., Wang Y., Teng Q., and Tan C. Combined delivery of paclitaxel and tanespimycin via micellar nanocarriers: pharmacokinetics, efficacy and metabolomic analysis. *PLoS One.*, **8** (3), e58619 (2013). DOI: 10.1371/journal.pone.0058619
23. Ui T., Morishima K., Saito S., Sakuma Y., Fujii H., Ho-soya Y., Ishikawa S., Aburatani H., Fukayama M., Niki T., and Yasuda Y. The HSP90 inhibitor 17-N-allyl-amino-17-demethoxy geldanamycin (17-AAG) synergizes with cisplatin and induces apoptosis in cisplatin-resistant esophageal squamous cell carcinoma cell lines via the Akt/XIAP pathway. *Oncol Rep.*, **31** (2), 619 (2014). DOI: 10.3892/or.2013.2899
24. Schmidt L., Issa I. I., Haraldsdóttir H., Hald J. J., Schmitz A., Due H., and Dybkær K. Hsp90 inhibition sensitizes DLBCL cells to cisplatin. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **89**, 431 (2022). DOI: 10.1007/s00280-022-04407-5
25. Li Z. N. and Luo Y. HSP90 inhibitors and cancer: Prospects for use in targeted therapies (Review). *Oncol Rep.*, **49** (1), 6 (2023). DOI: 10.3892/or.2022.8443
26. Magyar C. T. J., Vashist Y. K., Stroka D., Kim-Fuchs C., Berger M. D., and Banz V. Heat shock protein 90 (HSP90) inhibitors in gastrointestinal cancer: where do we currently stand? – A systematic review. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **149**, 8039 (2023). DOI: 10.1007/s00432-023-04689-z
27. Lang J. E., Forero-Torres A., Yee D., Yau C., Wolf D., Park J., Parker B. A., Chien A. J., Wallace A. M., Murthy R., Albain K. S., and Ellis E. D. Safety and efficacy of HSP90 inhibitor ganetespib for neoadjuvant treatment of stage II/III breast cancer. *NPJ Breast Cancer*, **8** (1), 128 (2022). DOI: 10.1038/s41523-022-00493-z
28. Becker B., Multhof, G., Farkas B., Wild P. J., Landthaler M., and Stolz W. Induction of Hsp90 protein expression in malignant melanomas and melanoma metastases. *Exp. Dermatol.*, **13** (1), 27 (2004). DOI: 10.1111/j.0906-6705.2004.00114.x
29. Petrenko V., Vrublevskaya V., Bystrova M., Masulis I., Kopylova E., Skarga Y., Zhmurina M., Morenkov O. Proliferation, migration, and resistance to oxidative and thermal stresses of HT1080 cells with knocked out genes encoding Hsp90α and Hsp90β *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **674**, 62 (2023). DOI: 10.1016/j.bbrc.2023.06.076
30. Chiang T. W., Le Sage C., Larrieu D., Demir M., and Jackson S. P. CRISPR-Cas9(D10A) nickase-based genotypic and phenotypic screening to enhance genome editing. *Sci. Rep.*, **6**, 24356 (2016). DOI: 10.1038/srep24356
31. Dasari S. and Tchounwou P. B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur. J. Pharmacol.*, **740**, 364 (2014). DOI: 10.1016/j.ejphar.2014.07.025
32. Kciuk M., Gielecinska A., Mujwar S., Kołat D., Kałuż-ńska-Kołat Z., Celik E., and Kontek R. Doxorubicin – an agent with multiple mechanisms of anticancer activity. *Cells*, **12** (4), 659 (2023). DOI: 10.3390/cells12040659
33. Bonvini P., Zorzi E., Basso G., and Rosolen A. Bortezomib-mediated 26S proteasome inhibition causes cell-cycle arrest and induces apoptosis in CD-30+ anaplastic large cell lymphoma. *Leukemia*, **21** (4), 838 (2007). DOI: 10.1038/sj.leu.2404528
34. Wilhelm S. M., Adnane L., and Newell P. Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets

- both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Mol. Cancer Ther.*, **7** (10), 3129 (2008). DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0013
35. Wang T. H., Wang H. S., and Soong Y. K. Paclitaxel-induced cell death: where the cell cycle and apoptosis come together. *Cancer*, **88** (11), 2619 (2000). DOI: 10.1002/1097-0142(20000601)88:11<2619::aid-cn-cr26>3.0.co;2-j
36. Kallas A., Pook M., Maimets M., Zimmermann K., and Maimets T. Nocodazole treatment decreases expression of pluripotency markers nanog and Oct4 in human embryonic stem cells. *PLoS One.*, **6** (4), e19114 (2011). DOI: 10.1371/journal.pone.0019114
37. Mo Q., Zhang Y., Jin X., Gao Y., Wu Y., Hao X., Gao Q., and Chen P. Geldanamycin, an inhibitor of Hsp90, increases paclitaxel-mediated toxicity in ovarian cancer cells through sustained activation of the p38/H2AX axis. *Tumour Biol.*, **37** (11), 14745 (2016). DOI: 10.1007/s13277-016-5297-2

The Role of Two Isoforms of Heat Shock Protein Hsp90 in Resistance of Human Fibrosarcoma Cells HT1080 to Hsp90 Inhibitors and Cytotoxic Drugs

V.S. Petrenko*, O.S. Morenkov*, Y.Y. Skarga*, M.A. Zhmurina*, and V.V. Vrublevskaya*

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

Intracellular heat shock protein 90 (Hsp90) performs important functions related to the folding, stabilization and degradation of various proteins in the cell, and prevents protein aggregation and denaturation under various types of stress. There are two isoforms of Hsp90, the inducible isoform Hsp90 α and the constitutive isoform Hsp90 β . Hsp90 β is thought to play a key role in the functioning of housekeeping proteins, while Hsp90 α plays an important role in the cellular response to stress. We explored for the first time the role of two Hsp90 isoforms in ensuring the resistance of human fibrosarcoma cells HT1080 to Hsp90 inhibitors and a number of antitumor drugs with different mechanisms of action. Both Hsp90 isoforms have been shown to make a comparable contribution to cell resistance to Hsp90 inhibitors, and one Hsp90 isoform is not able to completely compensate for the absence of another Hsp90 isoform under the influence of Hsp90 inhibitors. Both Hsp90 isoforms are also involved in ensuring cell resistance to cytotoxic anticancer drugs, with Hsp90 α likely playing a more important role than Hsp90 β in protecting cells from the cytotoxic effects of sorafenib and nocodazole. In the case of cisplatin, each of the Hsp90 isoforms is able to largely compensate for the absence of the other isoform. In the case of doxorubicin, bortezomib, sorafenib, paclitaxel, and nocodazole, the absence of one of the Hsp90 isoforms led to a significant decrease in cell resistance to anticancer drugs, which was especially pronounced in the case of paclitaxel and nocodazole. The Hsp90 inhibitor 17-AAG potentiates the effect of cytotoxic drugs on cells, providing the most pronounced synergy with paclitaxel and nocodazole. As a result, the important role of both Hsp90 isoforms in cell resistance to Hsp90 inhibitors and anticancer drugs with different mechanisms of action was determined for the first time. The data obtained indicate the prospects of developing Hsp90 α - or Hsp90 β -specific inhibitors for antitumor therapy and their combined use with known antitumor drugs.

Keywords: heat shock proteins Hsp90 α and Hsp90 β , Hsp90 inhibitors, cytotoxic drugs