

УДК 577.112.083

## РАЗРАБОТКА МЕТОДА ОЧИСТКИ БЕЛКА ТЕПЛОВОГО ШОКА 90 (HSP90) ИЗ ТКАНЕЙ ЖИВОТНЫХ

Снигирева А. В., Врублевская В. В., Скарга Ю. Ю., Евдокимовская Ю. В., Моренков О. С.

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биофизики клетки Российской академии наук, Пуцино, Россия (142290, г. Пуцино Московской области, ул. Институтская, 3), e-mail: snigireva.s@gmail.com*

Белок теплового шока семейства 90 (Hsp90) является молекулярным шапероном, играющим важную роль в функционировании клетки в нормальных и стрессовых условиях. Многие из внутриклеточных белков-клиентов Hsp90 связаны с онкогенезом. Кроме внутриклеточного Hsp90 обнаружены экстраклеточные Hsp90, которые принимают участие в индукции противоопухолевого иммунитета, стимулируют миграцию и инвазию опухолевых клеток. Внутриклеточные и экстраклеточные Hsp90 считаются перспективными молекулярными мишенями для создания препаратов противоопухолевого действия. Hsp90 из опухолевых клеток имеют потенциал в использовании в качестве противоопухолевых вакцин. Для проведения исследований Hsp90 и прикладных разработок на его основе необходимо наличие простых и эффективных методов очистки Hsp90 из тканей и клеток животных и человека. В данной работе описан новый метод очистки Hsp90 из тканей различных видов животных, основанный на тиофильной хроматографии. Отработаны условия очистки Hsp90 на тиофильном геле, позволяющие получать Hsp90 с чистотой до 80 % уже на этом этапе очистки. После дополнительной очистки Hsp90 с помощью ионообменной хроматографии чистота препарата Hsp90 составляла более 95 %, Hsp90 был функционально активен и стимулировал миграцию опухолевых клеток глиобластомы человека A-172 и фибросаркомы человека HT1080 *in vitro*.

Ключевые слова: Hsp90, очистка, тиофильная хроматография, миграция клеток.

## DEVELOPMENT OF THE METHOD FOR PURIFICATION OF HEAT SHOCK PROTEIN 90 (HSP90) FROM ANIMAL TISSUES

Snigireva A. V., Vrublevskaia V. V., Skarga Y. Y., Evdokimovskaya Y. V., Morenkov O. S.

*Federal State Institution of Science Institute of Cell Biophysics Russian Academy of Sciences (142290, Pushchino, Moscow region, Institutskaya st., 3) e-mail: snigireva.s@gmail.com*

Heat shock protein 90 (Hsp90) is a molecular chaperone that plays an important role in functioning of cells under normal and stress conditions. Many of intracellular Hsp90 client proteins are associated with oncogenesis. In addition to intracellular Hsp90, extracellular Hsp90 that participates in the induction of antitumor immunity, stimulates migration and invasion of tumor cells is identified. Intracellular and extracellular Hsp90 are considered as perspective molecular targets for the development of antitumor drugs. Hsp90 from tumor cells have the potential as anti-tumor vaccines. Simple and efficient methods for purification of Hsp90 from animal and human cells and tissues are required to implement further investigation of Hsp90 and make the development on its basis for potential applications. This study describes a new simple and efficient method for purification of Hsp90 from tissues of various animal species, using thiophilic chromatography. The conditions for purification of Hsp90 on thiophilic gel during which the purity of Hsp90 reached up to 80 % were found. Further purification of Hsp90 by ion exchange chromatography yielded the purity of the Hsp90 more than 95 %. Hsp90 was functionally active and stimulated migration of human glioblastoma tumor cells A-172 and human fibrosarcoma cells HT1080 *in vitro*.

Key words: Hsp90, purification, thiophilic chromatography, cell migration.

### Введение

Белок теплового шока семейства 90 (Hsp90) относится к классу внутриклеточных белков-шаперонов и обеспечивает фолдинг вновь синтезированных белков, сборку мультимолекулярных комплексов, участвуют в транспорте белков и пептидов между

клеточными органеллами и деградации белков, предотвращают агрегацию и денатурацию белков при различных видах стресса [1]. Выявлено более 100 внутриклеточных белков-клиентов Hsp90, многие из которых связаны с онкогенезом. В этой связи ингибирование внутриклеточного Hsp90 с помощью природных и синтетических ингибиторов оказалось перспективным направлением в создании противоопухолевых препаратов [9]. Кроме выполнения внутриклеточных функций, Hsp90 обнаружен во внеклеточном пространстве и на клеточной мембране [8], где участвует в формировании врожденного и приобретенного иммунитета, в том числе противоопухолевого иммунитета, способен выступать в качестве «сигнала опасности» в организме [1]. Комплексы Hsp90 с опухолевыми пептидами, очищенные из опухолевых клеток, рассматриваются в качестве возможных противоопухолевых вакцин. Показано, что экстраклеточный Hsp90 участвует в процессе миграции нормальных и опухолевых клеток, а также в инвазии опухолевых клеток [3, 4, 9]. Hsp90 способен стимулировать миграцию кератиноцитов, микроваскулярных эндотелиальных клеток и дермальных фибробластов при заживлении ран и может лечь в основу препаратов ранозаживляющего действия [1, 9]. Ингибирование экстраклеточного Hsp90 снижает инвазивность опухолевых клеток [9], в связи с чем экстраклеточный Hsp90 считается перспективной молекулярной мишенью для разработки противоопухолевых препаратов, ингибирующих метастазирование опухолей.

Для поиска ингибиторов внутриклеточного и экстраклеточного Hsp90, разработки противоопухолевых вакцин на основе Hsp90, а также разработки препаратов ранозаживляющего действия на основе Hsp90 необходимо наличие простых и эффективных методов очистки Hsp90 из тканей и клеток. Известные традиционные методы очистки Hsp90 являются многостадийными и включают несколько видов хроматографии: гидрофобную, ионообменную в сочетании с гель-фильтрацией и адсорбционную на колонке с гидроксилалатитом, являются достаточно продолжительными и малоэффективными [5]. Целью данной работы была разработка простого и эффективного метода очистки функционально активного Hsp90 из различных клеток и тканей с использованием тиофильной хроматографии.

### **Методика исследования**

В работе использовали клеточные линии A-172 (глиобластома человека), HT1080 (фибросаркома человека), ВНК21 (почка сирийского хомяка) и NIH3T3 (фибробласты мыши) из коллекции клеточных культур Института цитологии РАН. Клетки выращивали в среде ДМЕМ, содержащей 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (ЭБС) и антибиотики (по 40 ед. пенициллин, стрептомицин, гентамицин) (ДМЕМ-10%ЭБС). Мозги мыши получали от

мышей Balb/c из вивария Института биофизики клетки РАН. Мозги быка получали с бойни Серпуховского района.

Для очистки Hsp90, ткани мозга быка и мышцы гомогенизировали с использованием гомогенизатора Поттера в 6-ти объемах 10 мМ Трис-НСl буфера (рН 7,4), содержащего 10 мМ NaCl и ингибиторы протеаз (ФМСФ (1 мМ), апротинин (2 мкг/мл), леупептин (2 мкг/мл), пепстатин А (2 мкг/мл)). Гомогенат центрифугировали в течение 20 мин при 20000 g, надосадочную фракцию фильтровали и центрифугировали в течение 2 ч при 100000 g. К осветленному супернатанту добавляли аммоний сульфат (АС) до 40 %-ного насыщения и оставляли на 4 ч при температуре 4°C. Осадок белков удаляли центрифугированием (20 мин, 20000 g, 4°C). Супернатант доводили сухим АС до 80 %-ного насыщения, инкубировали в течение 12 ч при температуре 4°C, а затем центрифугировали (20 мин, 20 000 g, 4°C). Осадок (фракция 40–80 % АС) растворяли в фосфатно-солевом буферном растворе (ФСБР, 150 мМ NaCl, 5 мМ Na-фосфатный буфер, рН 7,3), содержащим 15 % АС (ФСБР-15%АС). Препарат трижды наносили на колонку с тиофильным гелем (Т-гель), уравновешенным в ФСБР-15 % АС. Т-гель получали по методу Porath et. al. (1985) [7]. Колонку промывали 100 объемами уравновешивающего буфера. Элюцию белков проводили ФСБР-5 % АС. Элюированные белковые фракции диализовали против 20 мМ Трис-НСl (рН 7,4) буфера, содержащего 20 мМ NaCl. Ионообменную хроматографию проводили с использованием ДЭАЭ-Сефарозы, уравновешенную буфером для диализа. Связавшиеся с носителем белки элюировали линейным градиентом NaCl 20-600 мМ в 20 мМ Трис-НСl (рН 7,4). Фракции анализировали с помощью электрофореза и Вестерн-блот анализа. Hsp90-содержащие фракции объединяли.

Электрофорез проводили в 10 %-ном полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия [2]. Для количественной оценки содержания специфических белков в препаратах гели сканировали и обрабатывали при помощи программы TotalLab v.2.01. Для выявления Hsp90 и других белков теплового шока в Вестерн-блот анализе использовали следующие специфические антитела: Hsp 90 $\alpha\beta$  (SC-59578, Santa Cruz), Hsp90 $\alpha$  (H1832-81, USBiological), Hsp90 $\beta$  (H1832-96, USBiological), Hsc70 (SPA 815, Stressgen), Hsp70 (SPA 810, Stressgen) и Hsp96 (SPA 850, Stressgen).

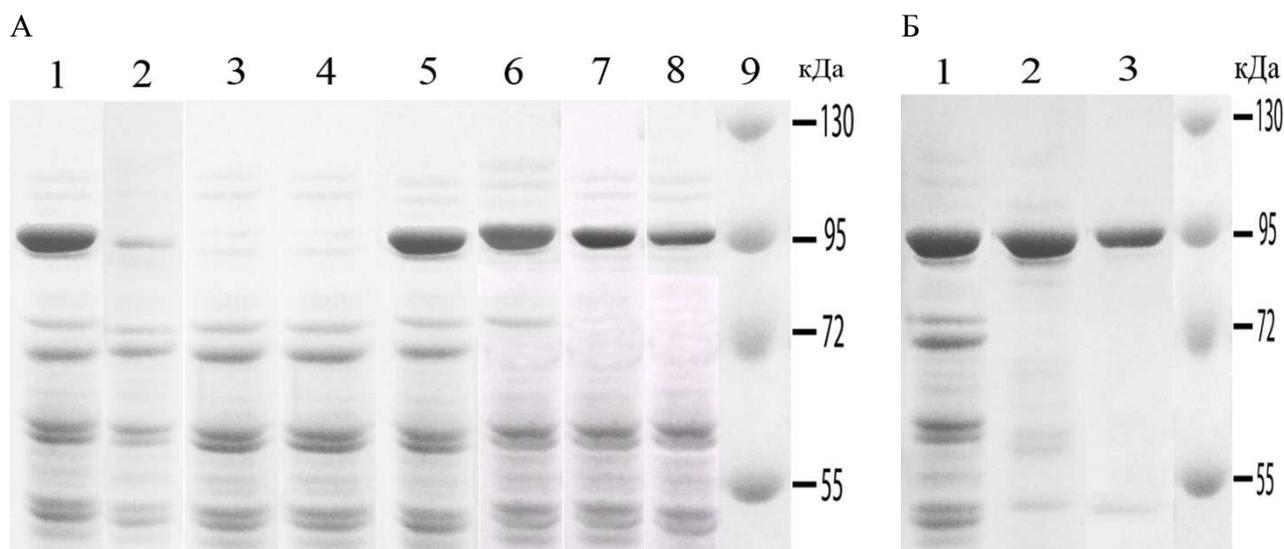
Для определения цитотоксичности и анти-пролиферативной активности Hsp90 (концентрации 1,0, 0,1 и 0,01 мг/мл) использовали МТТ-колориметрический метод [6]. Анализ проводили на клетках А-172 и НТ1080.

Определение миграции клеток методом нанесения «экспериментальной раны» на монослой клеток проводили с использованием клеток А-172 и ВНК-21, как описано ранее [3, 4]. Площадь зарастания исходной «раны» на клеточном монослое определяли через 6 ч после добавления исследуемых образцов. Определение миграции клеток с помощью вкладышей с

полиэтилентерефталат (PET) мембраной (CellSert, Millipore, размер пор 8 мкм) проводили с использованием клеток A-172, HT1080 и NIH3T3, в соответствии со стандартными протоколами. Перед экспериментом клетки выдерживали в среде ДМЕМ, содержащей 0,2 % БСА (ДМЕМ-БСА) в течение 20 ч при 37 °С (голодание). Во вкладыш помещали клетки в среде ДМЕМ-БСА, в качестве хемоаттрактанта в нижнем резервуаре использовали ДМЕМ-5 % ЭБС. Прошедшие за 6 ч через мембрану клетки фиксировали, окрашивали кристалл виолетом, лизировали, переносили в лунки 96-луночного планшета и измеряли оптическую плотность при длине волны 595 нм [4]. Влияние препаратов на миграцию клеток оценивали, сравнивая оптическую плотность  $A_{595}$  контрольных лунок и лунок, в которых клетки инкубировали с образцами Hsp90. Hsp90 исследовали в концентрации 0,1 мг/мл. В качестве контроля использовали среду без Hsp90, а также бычий сывороточный альбумин (БСА) и очищенный Hsp70 быка (концентрация 0,1 мг/мл). Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием t-теста Стьюдента (уровень значимости  $P < 0,05$ ).

### **Результаты и их обсуждение**

Первый этап работы был посвящен определению оптимальных условий связывания Hsp90 с Т-гелем и элюции Hsp90 с Т-геля. Для определения оптимальных условий связывания Hsp90 на Т-геле, Hsp90-содержащую фракцию (40–80 % АС) гомогената мозга, растворенную в ФСБР с разными концентрациями АС, наносили на носитель, предварительно уравновешенный теми же растворами. Элюцию связавшихся Hsp90 проводили в ФСБР, в котором наблюдается полная элюция Hsp90. Показано, что при увеличении концентрации АС эффективность связывания Hsp90 с Т-гелем увеличивалась: при 0–10 % АС Hsp90 не связывался с носителем, при концентрации АС 15–20 %, достигалось практически полное связывание Hsp90 с носителем (рис. 1). При 15 % АС в ФСБР достигалась достаточно высокая эффективность связывания Hsp90 с носителем (70–80 %) и более высокая чистота препарата на этом этапе очистки, в сравнении с 20 % АС (рис. 1).



**Рис. 1. А.** Отработка метода очистки Hsp90 на тиофильном геле. 1 – 4 – оптимизация условий связывания Hsp90 с носителем. Представлены данные электрофоретического анализа исходного препарата (фракция 40-80% АС мозга быка (1)) и фракций, прошедших через Т-гель при связывании в 15 % АС (2), в 20 % АС (3) в 25 % АС (4). 5 – 8 – оптимизация условий элюции Hsp90 с носителя. 5 – исходный препарат (фракция 40-80% АС мозга быка), 6, 7, 8 – фракции, элюированные в ФСБР, ФСБР-7,5 % АС и ФСБР-10 % АС, соответственно. 9 – белковые маркеры. **Б.** Чистота препарата Hsp90 на различных этапах очистки. 1 – фракция 40–80 % АС мозга быка; 2 – Hsp90 очищенный на Т-геле в оптимальных условиях; 3 – Hsp90 после ионообменной хроматографии

При отработке условий элюции Hsp90, исходный материал наносили на несколько колонок с Т-гелем при концентрации АС 40 %, обеспечивающей эффективную посадку белка на носитель, а элюирование проводили разными концентрациями АС в ФСБР. Показано, что Hsp90 полностью элюировался с носителя в ФСБР без АС. С увеличением концентрации АС эффективность элюции снижалась; при этом чистота препарата Hsp90 – увеличивалась. Для элюции, нами была выбрана 5 %-ная концентрация АС, как наиболее подходящая для получения максимально чистого белка, с минимальным содержанием примесей (Рис. 1).

Полный цикл очистки Hsp90 включал следующие этапы: гомогенизацию ткани, осветление гомогената центрифугированием, осаждение 40 % АС, осаждение 80 % АС, тиофильную и ионообменную хроматографии. После тиофильной хроматографии, проводимой в оптимальных условиях (посадка – ФСБР-15 % АС, элюция ФСБР-5 % АС) чистота Hsp90 составляла 75–80 %. После ионообменной хроматографии, чистота Hsp90 в объединенной Hsp90-содержащей фракции составляла 97–99 % (табл. 1). Hsp90 одинаково эффективно очищался из мозга быка и мыши. При этом очищались обе изоформы белка – Hsp90 $\alpha$  и Hsp90 $\beta$ , не контаминированные другими HSP (Hsp70, Hsc70 и Hsp96), что было

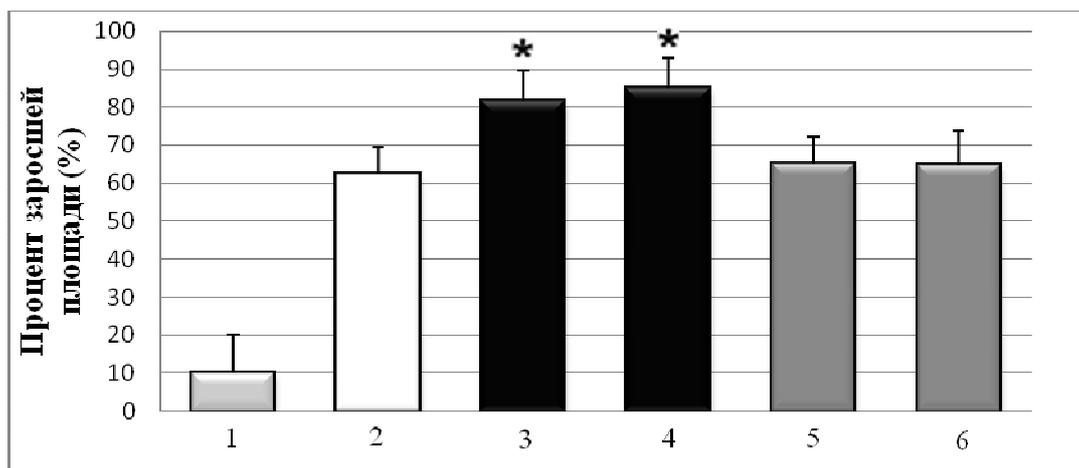
продемонстрировано с помощью Вестерн-блота с использованием антител, специфичных к Hsp90 $\alpha$ , Hsp90 $\beta$ , Hsp70, Hsc70 и Hsp96. Суммарный выход hsp90 составлял около 50 %.

**Таблица 1. Очистка Hsp90 из мозга быка с использованием тиофильной хроматографии**

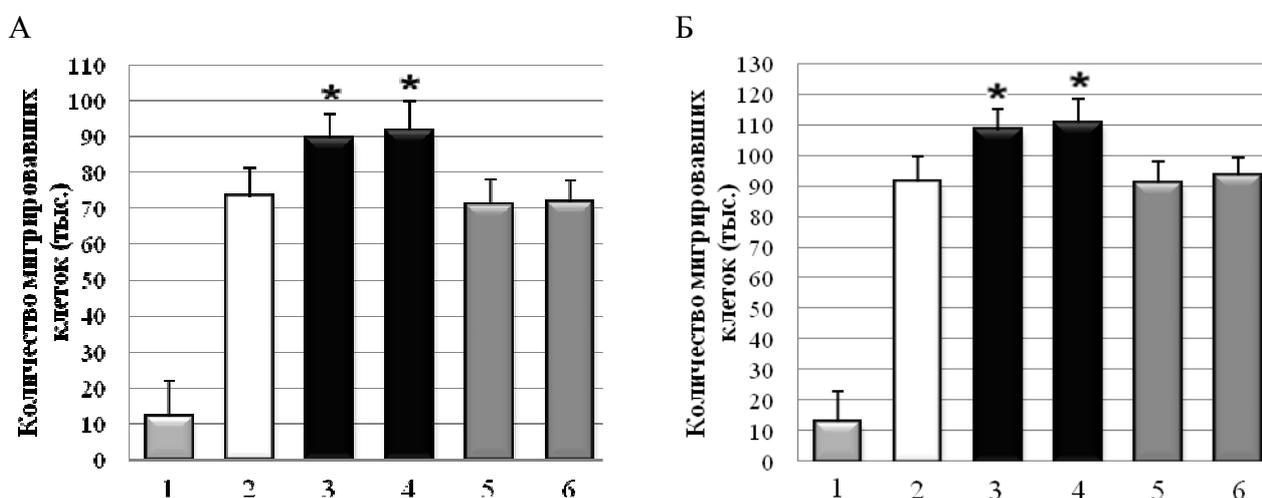
		Потери Hsp90 на разных этапах очистки, (%)	Степень чистоты Hsp90, (%)
Исходная ткань		0	~ 1,0
Гомогенат ткани (после центрифугирования при 20000 g)		20–25	1,0–1,5
Осветленный гомогенат ткани (после центрифугирования при 100000 g)		~ 5	1,5–2,0
Осаждение 40 % АС	Осадок 40 % АС	~ 5	
	Супернатант 40 % АС		3–4
Осаждение 80 % АС	Осадок 40–80 % АС		3–4
	Супернатант	~ 5	
Тиофильная хроматография		~ 10	75–80
Ионообменная хроматография		~ 10	95–97

Для оценки функциональной активности полученных препаратов Hsp90 исследовали способность Hsp90 стимулировать миграцию опухолевых клеток, описанную в литературе [4, 5]. Очищенные Hsp90 из мозга мыши и быка в концентрациях до 1,0 мг/мл не обладали прямой цитотоксичностью и не влияли на пролиферацию клеток А-172, НТ1080, ВНК-21 и НИНЗТЗ. С использованием метода определения скорости зарастания поврежденного участка монослоя клеток показано, что скорость миграции клеток А-172 в присутствии Hsp90 из мозга быка и мыши, была достоверно выше на  $30\pm 4$  % и  $35\pm 5$  %, по сравнению с контрольными лунками без HSP и лунками с контрольными белками – Hsp70 и БСА (0,1 мг/мл) (рис. 2). На немигрирующей культуре ВНК-21 был показан крайне низкий уровень миграции клеток.

С использованием метода оценки скорости миграции клеток через PET мембрану показано, что Hsp90 из мозга быка и мозга мыши стимулировал миграцию клеток А-172 через мембрану на  $21\pm 2$  % и  $25\pm 2$  %, в сравнении с контролем без Hsp90. В случае клеточной культуры НТ1080, в присутствии Hsp90 из мозга быка и мозга мыши количество мигрировавших клеток было на  $30\pm 2$  % и  $27,6\pm 2$  % больше, по сравнению с контролем без HSP. При отсутствии в нижнем резервуаре со средой хемоаттрактанта (ЭБС), опухолевые клетки практически не мигрировали (спонтанная миграция). На клетках немигрирующей культуры НИНЗТЗ миграция через мембрану была близка к значению спонтанной миграции клеток. Контрольные белки – БСА и Hsp70 из мозга быка в концентрации 0,1 мг/мл не влияли на миграцию опухолевых клеток (рис. 3).



**Рис. 2.** Влияние Hsp90 на миграцию клеток A-172 (метод «экспериментальной раны» на клеточном монослое). 1 – спонтанная миграция; 2 – контроль без Hsp90; 3 – Hsp90 (бык); 4 – Hsp90 (мышь); 5 – БСА; 6 – Hsp70. \* –  $P < 0,05$



**Рис. 3.** Влияние Hsp90 на миграцию опухолевых клеток A-172 (А) и HT1080 (Б) через PET мембрану (1 – спонтанная миграция; 2 – контроль без Hsp90; 3 – Hsp90 (бык); 4 – Hsp90 (мышь); 5 – БСА; 6 – Hsp70. \* –  $P < 0,05$

Полученные результаты свидетельствовали, что нативный Hsp90 из мозга мыши и быка, очищенный с помощью разработанного нами метода, достоверно стимулировал миграцию опухолевых клеток глиобластомы человека A-172 и фибросаркомы человека HT1080, что свидетельствовало о его функциональной активности.

Таким образом, разработан новый метод очистки Hsp90 с помощью тиофильной хроматографии, который позволяет получать нативный функционально активный Hsp90 из тканей различных видов животных с чистотой 97–99 %. Высокая чистота Hsp90 (до 80 %) достигалась уже на стадии хроматографии на Т-геле, что позволяет рассматривать этот носитель в качестве высокоспецифичного сорбента для очистки Hsp90.

## Список литературы

1. Csermely P., Schnaider T., Soti C., Prohaszka Z., Nardai G. The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review // *Pharmacol. Ther.* – 1998. – Vol. 79, № 2. – P. 129-168.
2. Laemmli U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 // *Nature* –1970. – Vol. 227. – P. 680-685.
3. Li W., Sahu D., Tsen F. Secreted heat shock protein-90 (Hsp 90) in wound healing and cancer // *Biochim Biophys Acta.* – 2012. – Vol. 1823(3). – P. 730-741.
4. McCready J., DSims J., Chan D., GJay D. Secretion of extracellular hsp90alpha via exosomes increases cancer cell motility: a role for plasminogen activation // *BMC Cancer.* – 2010. – V. 10:294.
5. Ménoret A, Bell G. Purification of multiple heat shock proteins from a single tumor sample // *J Immunol Methods.* – 2000. – Vol. 237 (1–2). – P. 119-130.
6. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. // *J. Immunol. Methods.* – 1983. – Vol. 65 (1–2). – P. 55-63.
7. Porath J., Maisano, F. and Belew, M. Thiophilic adsorption – a new method for protein fractionation // *FEBS Lett.* – 1985. – P. 306-310.
8. Schmitt E, Gehrman M, Brunet M, Multhoff G, Garrido C. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy // *J. Leuock Biol.* – 2007. – Vol. 81. – P. 15-27.
9. Sidera K., Patsavoudi E. Extracellular HSP90: An Emerging Target for Cancer Therapy // *Current Signal Transduction Therapy.* – 2009. – Vol. 4. – P. 51-58.

### Рецензенты:

Новоселов В. И., доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник «Лаборатории механизмов рецепции», Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биофизики клетки РАН, г. Пущино.

Акатов В. С., доктор физико-математических наук, профессор, заведующий «Лаборатории тканевой инженерии», Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пущино.