

АКТИВНОСТЬ ПРОТЕАСОМ В ТКАНЯХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ РАЗЛИЧНЫХ ЛОКАЛИЗАЦИЙ

Л.В. Спирина¹, И.В. Кондакова¹, Е.А. Усынин¹, Л.А. Коломиец^{1,2},
Е.Л. Чойнзонов^{1,2}, М.Р. Мухамедов¹, А.Л. Чернышова¹, Н.П. Шарова³

НИИ онкологии СО РАМН, г. Томск¹

ГОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет Росздрава», г. Томск²

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, г. Москва³

634050, г. Томск, пер. Кооперативный, 5, e-mail: KondakovaIV@oncology.tomsk.ru¹

В результате проведенного исследования активности протеасом у больных злокачественными опухолями различных локализаций установлены разнонаправленные их значения. В ткани опухоли почки происходило снижение активности протеасом по сравнению с окружающей неизменной тканью. При раке мочевого пузыря активность ферментов в опухоли не отличалась от их активности в окружающей ткани. В опухолевой ткани эндометрия и в плоскоклеточных карциномах головы и шеи активность протеасом была повышена по сравнению с окружающей неизменной тканью. Увеличение активности протеасом при злокачественных новообразованиях обусловлено увеличением активности пула 20S-протеасом.

Ключевые слова: активность протеасом, 20S протеасомы, 26S протеасомы, рак почки, рак мочевого пузыря, рак эндометрия, плоскоклеточные карциномы головы и шеи.

PROTEASOME ACTIVITY IN CANCER TISSUES

L.V. Spirina¹, I.V. Kondakova¹, Y.A. Usynin¹, L.A. Kolomiets^{1,2}

E.L. Choinzonov^{1,2}, M.R. Mukhamedov¹, A.L. Chernyshova¹, N.P. Sharova³

Cancer Research Institute, Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk¹

Siberian State Medical University, Tomsk²

Koltzov Institute of Developmental Biology RAS, Moscow¹

5, Kooperativny Street, 634009-Tomsk, e-mail: KondakovaIV@oncology.tomsk.ru¹

Proteasome activity in cancer tissues was studied. Proteasome activity was decreased in kidney cancer tissue compared with surrounding normal tissue. No difference in proteasome activity was observed between malignant and normal bladder tissue. Proteasome activity was higher in endometrial and head and neck squamous cell cancer tissues than in surrounding normal tissue. The elevated proteasome activity in cancer patients was associated with increased activity of 20S proteasome.

Key words: proteasome activity, 20S and 26S proteasomes, kidney cancer, bladder cancer, endometrial cancer, head and neck squamous cell carcinoma.

Развитие злокачественных новообразований тесно связано с комплексом протеаз, получивших название «раковый деградом», которые определяют такие важные свойства опухолей, как инвазия и метастазирование [13]. Кроме того, внутриклеточные протеолитические системы, расщепляя регуляторные и сигнальные белки, принимают участие в различных процессах – пролиферации, апоптозе и др. Наиболее важную роль в деградации белков клетки играет протеасомная система, которая представляет собой внутриклеточный ферментативный комплекс, отвечающий за специфический протеолиз белков. Протеасома обладает трипсиноподобной, химотрипсиноподобной, каспазной активностями. Выделяют 20S и 26S пулы протеасом [4, 8, 17]. Полный протеолиз происходит в 26S протеасоме, однако каталитической активностью обладает также 20S пул. Узнавание белков-мишеней, подлежащих расщеплению, осуществляется компонентами,

не принадлежащими протеолитическому комплексу, а именно, убиквитинами и белками, их переносящими [3, 16]. 26S протеасомы осуществляют убиквитин- и АТФ-зависимый протеолиз благодаря наличию в их составе 19S-субчастицы, способной распознавать убиквитинированные белки, а также расплетать их и проталкивать в протеолитическую камеру [8, 16]. 20S протеасомы гидролизуют белки, главным образом, с поврежденной третичной структурой независимо от убиквитина [11].

Протеасомы играют важную роль в поддержании функциональной активности клеток, в частности в регуляции работы сигнальных систем, которые активируются при взаимодействии ростовых факторов с соответствующими рецепторами [10, 12]. Нарушение в функционировании протеасомного комплекса связано со многими патологиями и имеет большое значение в развитии онкологических заболеваний. В экс-

периментальных условиях показано изменение активности и состава пула 26S протеасом в онкогенезе [2]. В настоящее время активно изучается роль убиквитинзависимого протеолиза в патогенезе злокачественных образований различных локализаций, в частности предстательной железы [14], молочной железы [7], кишечника [18] и др. Однако в этих исследованиях большое внимание уделяется изучению убиквитинирования белков, в то время как активность протеасом исследована недостаточно.

В связи с этим целью данной работы явилось изучение изменения активности протеасомной системы при раке почки, мочевого пузыря, эндометрия и при плоскоклеточном раке головы и шеи.

Материал и методы исследования

В исследование были включены 12 больных раком почки $T_{2-3}N_{0-1}M_{0-1}$ (средний возраст – $53,4 \pm 3,1$ года), 13 больных раком мочевого пузыря $T_{2-3}N_0M_0$ (средний возраст – $56,0 \pm 2,3$ года), 7 больных раком эндометрия $T_{1-2}N_0M_0$ (средний возраст – $66,57 \pm 2,1$ года) и 12 больных с опухолями гортани и гортаноглотки $T_{1-4}N_{0-2}M_0$ (средний возраст – $57,7 \pm 2,19$ года), проходивших комбинированное лечение в клиниках НИИ онкологии СО РАМН, г. Томск. Материалом исследования являлись опухолевая ткань почки, мочевого пузыря, эндометрия, гортани и гортаноглотки и визуально не измененная ткань, находящаяся на расстоянии не менее 1 см от границы опухолей. В 10 случаях опухоли почки диагностированы светлоклеточный почечноклеточный рак, в 2 – папиллярный почечноклеточный рак. В группе больных со светлоклеточным раком почки регионарные и отдаленные метастазы имели 2 больных. Среди больных раком мочевого пузыря не было больных с регионарными метастазами. Больные раком эндометрия были распределены по стадиям заболевания следующим образом: 5 пациентов имели IВ стадию, 2 – II стадию. При гистологическом исследовании ткани рака эндометрия верифицирован эндометриоидный рак в 6 образцах и в 1 случае – неэндометриоидный рак. Опухоли головы и шеи представляли собой плоскоклеточную карциному гортани и гортаноглотки. Регионарные лимфогенные метастазы имели 7 больных опухолями головы и шеи

Получение осветленных гомогенатов. Замороженную ткань (100 мг) гомогенизировали в жидком азоте, затем ресуспендировали в 300 мкл 50 мМ трис-НСl буфера (рН=7,5), содержащего 2 мМ АТФ, 5 мМ хлорид магния, 1 мМ дитиотреитол, 1 мМ ЭДТА и 100 мМ хлорид натрия. Гомогенат центрифугировали 60 мин при 10000g и 4°C. Супернатант (осветленный гомогенат) использовали для определения активности протеасом.

Фракционирование протеасом. Все процедуры проводили при 4°C. 100 мг ткани гомогенизировали в жидком азоте, затем ресуспендировали в 1000 мкл 50 мМ трис-НСl буфера (рН=7,8), содержащего 2 мМ АТФ, 5 мМ хлорид магния, 1 мМ ЭДТА и 100 мМ хлорид натрия. Гомогенат центрифугировали 60 мин при 10000g и 4°C на микроцентрифуге Eppendorf Centrifuge 5415R (Германия). Белки осветленных гомогенатов фракционировали с помощью сульфата аммония в два этапа. Фракцию, обогащенную 26S-протеасомами, получали добавлением сульфата аммония до 40 % насыщения, фракцию 20S-протеасом – добавлением сульфата аммония до 70 % насыщения [1]. Сульфат аммония до 40 % насыщения вносили порциями в течение 20 мин на магнитной мешалке. После полного растворения сульфата аммония препарат перемешивали в течение 20 мин, затем центрифугировали при 12500 об/мин в течение 20 мин, осадок растворяли в 250 мкл 20 мМ Трис-НСl буфера (рН 7,5), содержащего 2 мМ АТФ, 5 мМ хлорид магния, 1 мМ ЭДТА и 20 % глицерин. К полученной надосадочной жидкости добавляли сульфат аммония до 70 % насыщения. Процедуру высаливания проводили так же, как указано выше. Осадок растворяли в 250 мкл 20 мМ Трис-НСl буфера (рН 7,5), содержащего 1 мМ ЭДТА и 20 % глицерин.

Определение активности протеасом. Активность тотального пула протеасом, содержащего формы 26S и 20S, определяли в осветленных гомогенатах опухолевых и неизмененных тканей по гидролизу флуорогенного олигопептида Suc-LLVY-AMC, утилизирующегося химотрипсинподобными центрами протеасом [5]. Активность пулов 26S и 20S протеасом определяли в соответствующих фракциях, полученных из опухолевых и неизмененных тканей. Реакционная смесь для определения активности тотального пула протеасом и пула 26S протеасом содержала

20 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 1 мМ дитиотрейтола, 30 мкМ Suc-LLVY-AMC, 5 мМ MgCl₂ и 1 мМ АТФ. Реакционная смесь для определения активности пула 20S протеасом имела такой же состав за исключением MgCl₂ и АТФ. Реакцию проводили при 37°C в течение 20 мин. Образовавшийся продукт регистрировали на флуориметре «Hitachi-850» (Япония) при длине волны возбуждения 380 нм и эмиссии 440 нм. За единицу активности протеасом принимали количество фермента, при котором гидролизуеться 1 нмоль Suc-LLVY-AMC в течение 1 мин. Удельную активность протеасом выражали в единицах активности на 1мг белка. Содержание белка определяли по методу Лоури [15].

В таблице все результаты представлены как $m \pm M$, где m – среднее выборочное, M – ошибка среднего. Значимость различий исследовали при помощи непараметрического критерия Манна–Уитни. Степень и значимость корреляционной связи между показателями оценивали с помощью коэффициента Спирмена. Статистическую обработку результатов проводили с применением пакета статистических программ Statistica 6.0.

Результаты и обсуждение

В результате проведенного исследования выявлено, что протеасомная активность в ткани рака почки значительно выше, чем в прилегающей ткани (таблица). Следует отметить, что на активность протеасом существенное влияние оказывал гистологический тип рака почки. При выделении группы с почечноклеточным светлоклеточным раком протеасомная активность в ткани опухоли была достоверно ниже (в 4,3 раза) по сравнению с неизменной тканью ($37,5 \pm 5,0 \times 10^3$ Ед/мг белка). При папиллярном варианте рака почки активность была повышена до $237,4 \times 10^3$ Ед/мг, что требует

дополнительного исследования. Снижение активности ферментов в ткани светлоклеточного рака почки, вероятно, ассоциировано с дефектом Е3 лигазы, фермента внутриклеточной убиквитин-зависимой системы [6, 12].

Протеасомная активность в ткани мочевого пузыря не отличалась от этого показателя в неизменной ткани (таблица).

В ткани рака эндометрия активность протеасом была достоверно выше по сравнению с неизменной тканью (соответственно $65,11 \pm 16,94 \times 10^3$ Ед/мг белка и $30,48 \pm 1,14 \times 10^3$ Ед/мг белка). В случае неэндометриодного рака активность ферментов повышалась до 150×10^3 Ед/мг белка.

Активность протеасом в ткани плоскоклеточных карцином головы и шеи была достоверно выше по сравнению с ее активностью в неизменной ткани (таблица). Для изучения особенностей высокой активности протеасом в опухолях данной локализации было проведено фракционирование протеасом. На рис. 1 представлена активность 26S и 20S пулов протеасом в неизменной и опухолевой тканях. В опухолевой ткани была отмечена трехкратная разница между активностями различных пулов протеасом, в то время как в неизменной ткани активность 26S пула была незначительно ниже 20S пула. Активность 20S фракции в опухолевой ткани была выше на $11,85 \times 10^3$ Ед/мг белка по сравнению с активностью фракции в неизменной ткани. Однако различий в активности 26S-протеасом в опухолевой и неизменной тканях не обнаружено. Следовательно, рост активности протеасом в опухолевой ткани происходит за счет 20S фракции. При изучении связи показателей внутриклеточного протеолиза и протеолиза в отдельных фракциях в опухолевой

Таблица

Протеасомная активность при раке почки, мочевого пузыря, эндометрия и при плоскоклеточных карциномах головы и шеи

Вид опухоли	n	Протеасомная активность неизменной ткани, $\times 10^3$ Ед/мг белка	n	Протеасомная активность ткани опухоли, $\times 10^3$ Ед/мг белка
Рак почки	6	$117,6 \pm 17,3$	12	$50,7 \pm 46,2^*$
Рак мочевого пузыря	5	$43,6 \pm 10,5$	13	$47,2 \pm 6,8$
Рак эндометрия	7	$30,5 \pm 1,1$	7	$65,1 \pm 16,9^*$
Плоскоклеточные карциномы головы и шеи	3	$14,4 \pm 0,7$	12	$35,5 \pm 4,6^*$

Примечание: * – различия статистически значимые ($p < 0,05$).

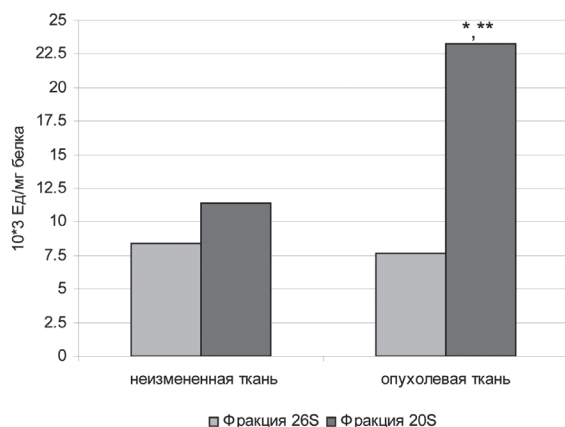


Рис. 1. Активность 26S и 20S протеасом в неизменной и опухолевой ткани (плоскоклеточный рак головы и шеи). Примечание: * – значимость различий между активностью 20S протеасом неизменной и опухолевой ткани ($p < 0,05$); ** – значимость различий между активностью 26S и 20S протеасом опухолевой ткани ($p < 0,05$)

ткани показана зависимость общей активности протеасом от активности 20S фракции ($R=0,86$; $p=0,0001$). Известно, что 20S протеасома способна разрушать мелкие пептиды [9]. Вероятно, накопление ростовых факторов, метаболитов и других биологически активных веществ приводит к стимуляции внутриклеточного протеолиза и усиленной сборке мультикаталитических субъединиц ферментов. Однако сборка 26S-протеасом требует большого временного периода, поэтому расщепление пептидов в опухолях преимущественно происходит в 20S-протеасомах.

Таким образом, в результате проведенного исследования активности протеасом у больных злокачественными опухолями различных локализаций установлены разнонаправленные их значения. В ткани опухоли почки наблюдается более высокая активность протеасом в окружающей ткани, по сравнению со злокачественной, что, вероятно, может служить признаком распространенности процесса. При переходноклеточном раке мочевого пузыря не было выявлено различий в активности протеасом опухоли и в неизменной ткани. В опухолевой ткани эндометрия и при плоскоклеточных карциномах головы и шеи происходит увеличение активности протеасом в опухоли по сравнению с окружающей тканью. Активация внутриклеточного специфического протеолиза связана с увеличением активности пула 20S

протеасом, который осуществляет разрушение поврежденных белков, метаболитов и биологически активных пептидов, регулируя множество процессов, важных для развития опухолей.

Работа частично выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 08–04–00616а)

ЛИТЕРАТУРА

1. Абрамова Е.Б., Астахова Т.М., Ерохов П.А., Шарова Н.П. Множественность форм протеасомы и некоторые подходы к их разделению // Известия РАН. Серия «Биология». 2006. № 2. С. 150–156.
2. Астахова Т.М., Шарова Н.П. Исключение иммунных протеасом из клеток асцитной карциномы Krebs-II мыши // Известия РАН. Серия «Биология». 2006. № 3. С. 275–283.
3. Ротанова Т.В., Мельников Э.Э. АТФ-зависимые протеиназы и протеолитические комплексы внутриклеточной деградации белков // Биомедицинская химия. 2008. Т. 54, вып. 5. С. 512–530.
4. Шарова Н.П., Астахова Т.М., Бондарева Л.А. и др. Особенности формирования пулов протеасом в селезенке и печени крыс в постнатальном развитии // Биохимия. 2006. Т. 71, вып. 9. С. 1278–1286.
5. Ben-Shahar S., Komlosch A., Nadav E. et al. 26S proteasome-mediated production of an authentic major histocompatibility class I-restricted epitope from an intact protein substrate // J. Biol. Chem. 1999. Vol. 274. (31). P. 21963–21972.
6. Charleswirth P.J.S., Harris A.L. Mechanism of disease: angiogenesis in urologic malignancies // Nature Clin. Pract. 2006. Vol. 3. P. 157–169.
7. Chen C., Seth A.K., Aplin A.E. Genetic and expression aberrations of E3 ubiquitin ligases in human breast cancer // Mol. Cancer Res. 2006. Vol. 4. P. 695–707.
8. Dahlmann B. Role of proteasomes in disease // BMC Biochemistry. 2007. Vol. 8. P. 2091–3013.
9. Emmerich N.P.N., Nussbaum A.K., Stevanovic S. et al. The Human 26 S and 20 S Proteasomes Generate Overlapping but Different Sets of Peptide Fragments from a Model Protein Substrate // J. Biol. Chem. 2000. Vol. 275. P. 21140–21148.
10. Girmita L., Girmita A., Larson O. Mdm-2-dependent ubiquitination and degradation of the insulin-like growth factor 1 receptor // PNAS. 2003. Vol. 100. P. 8247–8252.
11. Grune T., Reinheckel T., Davies K.J.A. Degradation of oxidized proteins in K562 human hematopoietic cells by proteasome // J. Biol. Chem. 1996. Vol. 271. P. 15504–15509.
12. Kim W.Y., Kaelin W.G. The role of VHL mutation in human cancer // J. Clin. Oncol. 2004. Vol. 22. P. 4991–5004.
13. Lah T.T., Duran Alonso M.B., Van Noorden C.J. Antiprotease therapy in cancer: hot or not? // Expert. Opin. Biol. Ther. 2006. Vol. 6 (3). P. 257–279.
14. Li B., Dou Q.P. Bax degradation by the ubiquitin/proteasome-dependent pathway: Involvement in tumor survival and progression // Biochemistry. 2000. Vol. 97 (8). P. 3850–3855.
15. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193. P. 265–275.
16. Orłowski M., Wilk S. Ubiquitin-independent proteolytic functions of the proteasome // Arch. Biochem. Biophys. 2003. Vol. 415 (1). P. 1–5.
17. Sharova N., Zakharova L. Multiple forms of proteasomes and their role in tumor fate // Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery. 2008. Vol. 2 (3). P. 152–161.
18. Voutsadakis I.A. The ubiquitin-proteasome system in colorectal cancer // J. Cell Mol. Med. 2007. Vol. 11(2). P. 252–337.

Поступила 9.12.08