

Активность протеасом и их субъединичный состав при раке почки и мочевого пузыря

Л.В. Спирина¹, И.В. Кондакова¹, Е.А. Усынин¹, Н.П. Шарова²

¹НИИ онкологии СО РАМН, Томск;

²Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва

Контакты: Евгений Александрович Усынин gusi70@list.ru

В результате проведенного исследования выявлено снижение химоทริปсиноподобной активности тотального пула протеасом и пулов 26S- и 20S-протеасом в ткани светлоклеточного рака почки по сравнению с неизменной тканью. Обнаружено повышенное содержание $\alpha 1-\alpha 7$ -субъединиц протеасом в ткани рака почки по сравнению с неизменной тканью, что сочетается со снижением содержания LMP2- и PA28 β -субъединиц. В опухоли мочевого пузыря наблюдается увеличение активности 26S-протеасом, снижение экспрессии $\alpha 1-\alpha 7$ и повышение содержания LMP2-субъединицы в составе протеасом. Установлена связь активности 26S-протеасом нормальной ткани почки с отдаленным метастазированием. В ткани рака мочевого пузыря выявлены зависимость экспрессии $\alpha 1-\alpha 7$ -субъединиц протеасом от размера опухоли, а также зависимость активности 26S-протеасом в опухоли от степени ее гистологической дифференцировки.

Ключевые слова: активность протеасом, субъединичный состав протеасом, рак почки, рак мочевого пузыря

The activity of proteasomes and their subunit composition in cancer of the kidney and urinary bladder

L.V. Spirina¹, I.V. Kondakova¹, E.A. Usynin¹, N.P. Sharova²

¹Cancer Research Institute, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk;

²N.K. Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow

The study revealed a reduction in the chymotrypsin-like activity of the total pool of proteasomes and their 26S and 20S pools in the tissue of clear-cell carcinoma of the kidney versus intact tissue. Renal cancer tissue was found to contain the higher levels of the proteasome subunits $\alpha 1\alpha 2\alpha 3\alpha 5\alpha 6\alpha 7$ than did intact tissues, which was accompanied by the lower content of the subunits LMP2 and PA28 β . A urinary bladder tumor showed the enhanced activity of the 26S proteasomes and the lower expression of $\alpha 1\alpha 2\alpha 3\alpha 5\alpha 6\alpha 7$ and the elevated level of the LMP2 subunit as part of proteasomes. Intact renal tissue 26S proteasome activity was found to be related to late tumor spread. Urinary bladder cancer tissue showed a correlation between the expression of the proteasome subunits $\alpha 1\alpha 2\alpha 3\alpha 5\alpha 6\alpha 7$ and the size of a tumor and that between 26 proteasome activity and the degree of histological tumor differentiation.

Key words: proteasome activity, proteasome subunit composition, renal cancer, urinary bladder cancer

Введение

Деградация белков в клетке, которую осуществляют протеасомы, играет важную роль в процессе развития злокачественных новообразований [1, 2]. В настоящее время хорошо известно значение протеасом в регуляции клеточной дифференцировки, пролиферации, апоптозе [3]. Протеасомы представлены 26S- и 20S-субпопуляциями, которые имеют разные функции в клетке. Полный специфический протеолиз происходит в 26S-протеасоме, которая расщепляет белки, несущие специальные маркеры-убиквитины. В 20S-протеасоме разрушаются аномальные и короткоживущие белки без присоединения убиквитинов [4].

Протеасомы представлены конститутивными и иммунными формами. Известно, что появление иммунных типов (LMP7, LMP2, PA28) субъединиц в составе протеасом связано с изменением их фермен-

тативной активности [5]. В экспериментальных условиях показано, что уменьшение содержания в составе протеасом LMP2 и LMP7 приводит к снижению химо-трипсиноподобной активности протеасом [6]. Основная функция иммунных протеасом — презентация комплексов гистосовместимости I типа. Однако было показано, что иммунные протеасомы могут проявлять неиммунные свойства [7].

Развитие и прогрессирование злокачественных новообразований почки и мочевого пузыря тесно связаны с изменением состояния протеасомной системы [8]. Известно, что развитие светлоклеточного рака почки (РП) связано с дефектом убиквитинирования при синдроме фон Гиппеля—Линдау (дефект E3-лигазы) [9]. На культуре клеток продемонстрирован антипролиферативный эффект применения ингибитора протеасом — бортезомиба в случае развития

почечно-клеточного рака (ПКР) [10], что связано с накоплением проапоптотических белков [11]. Отмечена высокая эффективность использования препарата на культуре раковых клеток мочевого пузыря, что приводило к уменьшению экспрессии проангиогенных факторов, а также к снижению плотности микрососудов [12]. Тем не менее в настоящее время пока еще не изучено значение различных форм протеасом и их субъединичного состава в развитии РП и рака мочевого пузыря (РМП).

Цель исследования – изучение активности и субъединичного состава протеасом в ткани РП и РМП с учетом клинико-морфологических параметров заболевания.

Материалы и методы

В исследование вошли 2 группы пациентов. Первую группу составили 26 больных светлоклеточным РП T1–4N0–1M0–1 (средний возраст $56,7 \pm 2,2$ года), вторую – 26 пациентов с переходно-клеточным РМП различной степени дифференцировки T1–3N0M0 (средний возраст $57,2 \pm 1,8$ года). Материал исследования был представлен биопсийными и послеоперационными образцами опухолевой и гистологически не измененной ткани, находящейся на расстоянии ≥ 1 см от границы опухолей. После взятия образцы ткани замораживали и хранили при температуре -80°C .

Получение осветленных гомогенатов. Замороженную ткань (100 мг) гомогенизировали в жидком азоте, затем ресуспендировали в 300 мкл 50 мМ трис-НСI-буфера (рН 7,5), содержащего 2 мМ аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ), 5 мМ хлорида магния, 1 мМ дитиотреитола, 1 мМ этилендиаминтетра-ацетата (ЭДТА) и 100 мМ хлорида натрия. Гомогенат центрифугировали в течение 60 мин при 10 000 об/мин и температуре 4°C .

Фракционирование протеасом. Все процедуры осуществляли при температуре 4°C . Белки осветленных гомогенатов фракционировали с помощью сульфата аммония в 2 этапа. Фракцию, обогащенную 26S-протеасомами, получали добавлением сульфата аммония до 40% насыщения, фракцию 20S-протеасом – добавлением сульфата аммония до 70% насыщения [13].

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 химоотрипсиноподобными центрами протеасом [14]. Реакционная смесь для определения активности тотального пула протеасом и пула 26S-протеасом содержала 20 мМ Tris-НСI (рН 7,5), 1 мМ дитиотреитола, 30 мкМ Suc-LLVY-AMC, 5 мМ MgCl_2 и 1 мМ АТФ. Реакционная смесь для установления активности пула 20S-протеасом имела такой же состав за исключени-

ем MgCl_2 и АТФ. Реакцию проводили при температуре 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 гидролизуется 1 нмоль Suc-LLVY-AMC в течение 1 мин. Удельную активность протеасом выражали в единицах активности на 1 мг белка. Содержание белка определяли по методу Лоури.

Электрофорез. Электрофорез выполняли с помощью метода Лаеммли в 13% полиакриламидном геле. Пробы наносили в буфере, содержащем 0,0625 М трис-НСI (рН 6,8), 2% SDS, 5% 2-меркаптоэтанол, 10% глицерин, 0,01% бромфеноловый синий.

Вестерн-блоттинг. После электрофореза белков осветленных гомогенатов в 13% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия осуществляли перенос полипептидов на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-ECL («Amersham», США). Мембрану инкубировали в течение 2 ч при температуре 20°C в буфере TNT, содержащем 10 мМ Tris-НСI (рН 7,5), 150 мМ NaCl, 0,1% Tween-20. Затем мембрану инкубировали в том же буфере, содержащем 5% обезжиренное молоко и моноклональные антитела к субъединицам $\alpha 1\alpha 2\alpha 3\alpha 5\alpha 6\alpha 7$, LMP7, LMP2 или PA28 β -протеасом в разведении 1:2500, отмывали несколько раз буфером TNT и инкубировали в течение 1 ч в буфере TNT с 5% обезжиренным молоком и антителами к IgG мыши, конъюгированными с пероксидазой, в разведении 1:10 000. После отмывки мембрану подвергали стандартной обработке системой хемилюминесцентной детекции белков («Amersham», США). Плотность полос была определена с помощью стандартной компьютерной программы Image J. Результаты выражали в процентах от содержания субъединиц протеасом в неизмененной ткани.

Статистическую обработку результатов проводили с применением пакета статистических программ Statistica 6.0. Значимость различий исследовали при помощи непараметрического критерия Манна–Уитни. В таблицах все результаты представлены как $m \pm M$, где m – среднее выборочное, M – ошибка среднего.

Результаты и обсуждение

В результате проведенного исследования изучена активность тотального пула протеасом и пулов 26S- и 20S-протеасом в ткани светлоклеточного РП и гистологически не измененной ткани (табл. 1).

Тотальная активность и активность 26S-пула протеасом в ткани опухоли были ниже по сравнению с таковыми в соответствующей нормальной ткани в 3,5 и 2,4 раза соответственно. Активность 20S-протеасом уменьшалась в ткани РП в 2,5 раза по сравнению с неизмененной тканью. Известно, что интенсивный протеолиз в ткани почки существует в физиологических

Таблица 1. Активность тотального пула протеасом и пулов 26S- и 20S-протеасом в ткани светлоклеточного РП и гистологически не измененной ткани

Ткань	РП			РМП		
	тотальный	26S	20S	тотальный	26S	20S
Опухолевая	36,2±5*	12,3±1,9*	31,9±7,1*	54,8±8,4	15,4±1,5*	41,9±4,7
Нормальная	126,9±6,9	29,9±6,9	79,4±14	44,0±8,4	7±1,1	33,5±6,6

Примечание. *Здесь и в табл. 2: достоверность различий по сравнению с нормальной тканью, $p < 0,05$.

условиях и связан с процессами деградации альбумина в проксимальных канальцах почки [15]. Следовательно, снижение активности протеолиза при злокачественной трансформации тканей почки, возможно, связано с нарушением функции почечного эпителия.

Изучение субъединичного состава протеасом в ткани РП показало повышение содержания $\alpha 1-\alpha 7$ -субъединиц в осветленном гомогенате (тотальной фракции протеасом) на 43,3% по сравнению с их содержанием в нормальной ткани (табл. 2). Экспрессия иммунных субъединиц протеасом LMP2 и PA28 β снижалась на 24,6% по сравнению с данным показателем в неизменной ткани в обоих случаях. Установлено, что уменьшение содержания LMP2-субъединицы связано с эффектом ускользания от иммунного ответа, что показано на культуре РП [16].

Таблица 2. Содержание субъединиц протеасом в тканях РП и РМП

Субъединица протеасом	Содержание субъединиц протеасом в опухолевой ткани, %	
	светлоклеточный РП	переходно-клеточный РМП
$\alpha 1-\alpha 7$	143,3±13,6*	77,1±8,1*
LMP7	105,2±9,7	124,8±14,1
LMP2	75,4±9,7*	156,2±19*
PA28 β	75,4±8,5*	115,6±19

Активность тотального пула протеасом в ткани опухоли мочевого пузыря имела тенденцию к повышению по сравнению с таковой в нормальной ткани (см. табл. 1). Выявлено увеличение активности 26S-пула протеасом в опухоли мочевого пузыря в 2,2 раза по сравнению с данным показателем в гистологически не измененной ткани. Активность 20S-пула протеасом достоверно не различалась в ткани опухоли и неизменной ткани. Вероятно, при РМП увеличивается интенсивность полного специфического протеолиза, который, как правило, происходит при участии убиквитинов.

При изучении субъединичного состава протеасом в ткани переходно-клеточного РМП установлено,

что содержание в ней $\alpha 1-\alpha 7$ -субъединиц протеасом было меньше на 22,9% по сравнению с их содержанием в нормальной ткани ($p < 0,05$). Экспрессия LMP7- и PA28 β -субъединиц протеасом не отличалась от таковой в неизменной ткани. Однако содержание LMP2-субъединицы протеасом увеличивалось на 56,2% по сравнению с этим показателем в неизменной ткани.

Большое влияние на активность протеасом оказывает их субъединичный состав. В результате проведенного корреляционного анализа выявлено, что содержание LMP2-субъединицы протеасом связано с активностью 26S-протеасом в неизменной ткани РП ($R=0,4; p=0,05$) и активностью 26S-протеасом в ткани РМП ($R=0,6; p=0,0004$). По-видимому, встраивание LMP2-субъединицы в протеасому приводит к усилению активности пула 26S-протеасом в неизменной ткани почки и в ткани РМП. Эти результаты согласуются с данными J.B. Almond и G.M. Cohen [5], которые показали, что появление в протеасоме иммунных субъединиц способствует увеличению ее активности.

При изучении связи исследуемых показателей с клинико-морфологическими параметрами заболевания обнаружено увеличение активности 26S-протеасом на 2200 МЕ/мг белка в морфологически не измененной ткани метастатического РП по сравнению с данным показателем у больных со стадией M0 ($p < 0,05$). Очевидно, данный факт связан с вовлеченностью неизменной ткани в процесс развития опухоли. Известно, что в процессе канцерогенеза нормальная окружающая ткань начинает приобретать молекулярно-генетические свойства, способствующие прогрессии и росту опухоли [17, 18].

В ходе исследования связи активности и субъединичного состава протеасом с клинико-морфологическими параметрами РМП установлено, что экспрессия $\alpha 1-\alpha 7$ -субъединиц протеасом в группе пациентов со стадией T2 была повышена на 5% ($p < 0,05$) по сравнению с таковой в группе больных со стадией T3. Размер опухоли является важным параметром, связанным с изменениями многих молекулярно-биологических маркеров. Вероятно, рост опухоли сопровождается снижением содержания конститутивных субъединиц протеасом ($\alpha 1-\alpha 7$), что позволяет

судить об интенсивности процессов деградации при развитии опухоли.

При изучении связи исследуемых показателей со степенью гистологической дифференцировки опухоли мочевого пузыря выявлено, что активность 26S-протеасом в высокодифференцированных опухолях составляла $14,8 \pm 2,6 \times 10^3$ МЕ/мг белка, тогда как в ткани умеренно-дифференцированной опухоли она повышалась на $2,1 \times 10^3$ ($p < 0,05$) и составляла $16,9 \pm 1,4 \times 10^3$ МЕ/мг белка. Экспрессия АТФ-независимой субъединицы 26S-протеасом при гепатоцеллюлярном раке печени связана с дифференциальным статусом опухоли [19]. Полученные в нашем исследовании данные также свидетельствуют о возможной связи степени гистологической дифференцировки с активностью 26S-пула протеасом при переходном-клеточном РМП. Наблюдается увеличение интенсивности специфического протеолиза при снижении степени гистологической организации опухоли.

Заключение

В ходе анализа полученных результатов установлено, что тотальная активность протеасом и активность пулов 26S- и 20S-протеасом являются тканеспецифичными показателями. Высокая активность протеасом в нормальной ткани почки необходима для деградации белков при ультрафильтрации мочи. При опухолевой трансформации происходит нарушение нормальной почечной функции, что приводит к значительному снижению протеасомной активности. Второй причи-

ной возникновения этого эффекта при светлоклеточном РП, связанном с синдромом фон Гиппеля—Линдау, является, вероятно, наличие дефекта E3-лигазы, способствующего снижению активности протеасом в опухоли. Активность протеасомной системы связана с субъединичным составом при РП и РМП. Выявлены разнонаправленные изменения активности протеасом, сопровождающиеся изменением их субъединичного состава при светлоклеточном РП и переходноклеточном РМП. Общей закономерностью является повышение активности пула 26S-протеасом при увеличении встраивания субъединицы LMP2 в протеасому. Активность и субъединичный состав протеасом связаны с клинико-морфологическими параметрами заболеваний. Для РП характерна вовлеченность окружающей неизменной ткани в процесс метастазирования. Увеличение размеров опухоли мочевого пузыря сопровождается повышением активности протеасом, что протекает на фоне снижения экспрессии $\alpha 1-\alpha 7$ -субъединиц протеасом. Кроме того, увеличение активности 26S-протеасом в ткани РМП наблюдается при снижении степени дифференцировки опухоли. Результаты исследования указывают на важность протеасомной деградации белков в развитии злокачественных опухолей почки и мочевого пузыря, а обнаруженные закономерности изменения изучаемых показателей в связи с клинико-морфологическими параметрами заболевания могут иметь важное значение для практической онкологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Спирина Л.В., Кондакова И.В., Чойнзонов Е.Л. и др. Активность протеасом в тканях злокачественных опухолей различных локализаций. Сиб онкол журн 2009;(5):49–52.
2. Sharova N., Zakharova L. Multiple forms of proteasomes and their role in tumor fate. Recent Patents on Endocrin Metabol Immune Drug Discov 2008; 2(3):152–61.
3. Dahlmann B. Role of proteasomes in disease. Biochemistry 2007;8:2091–3013.
4. Ротанова Т.В., Мельников Э.Э. АТФ-зависимые протеиназы и протеолитические комплексы внутриклеточной деградации белков. Биомед хим 2008;54(5):512–30.
5. Almond J.B., Cohen G.M. The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy. Leukemia 2002;16:433–43.
6. Frisan T., Levitsky V., Polack A. et al. Phenotype-dependent differences in proteasome subunit composition and cleavage specificity in B cell lines. J Immunol 1998;160:3281–9.
7. Kotamraju S., Matalon S., Matsunaga T. et al. Upregulation of immunoproteasomes by nitric oxide: potential antioxidative mechanism in endothelial cells. Free Rad Biol Med 2006;40:1034–44.
8. Cusack J.C. Rationale for the treatment of solid tumors with the proteasome inhibitor bortezomib. Cancer Treat Rev 2003;29:21–31.
9. Charlesworth P.J.S., Harris A.L. Mechanism of disease: angiogenesis in urologic malignancies. Nature Clin Pract 2006;3:157–69.
10. Vaziri S.A.J., Grabowski D.R., Hill J. et al. Inhibition of proteasome activity by bortezomib in renal cancer cells is p53 dependent and VHL independent. Anticancer Res 2009;29:2961–9.
11. Chen Z., Ricker J.L., Malholtra P.S. et al. Differential bortezomib sensitivity in head and neck cancer lines corresponds to proteasome, nuclear factor-kappa B and activator protein-1 related mechanisms. Mol Cancer Ther 2008;7(7):1949–60.
12. Kamat A.M., Karashima T., Davis D.W. et al. The proteasome inhibitor bortezomib synergizes with gemcitabine to block the growth of human 253JB-V bladder tumors in vivo. Mol Cancer Ther 2004;3:279–90.
13. Абрамова Е.Б., Астахова Т.М., Ерохов П.А., Шарова Н.П. Множественность форм протеасомы и некоторые подходы к их разделению. Изв РАН Сер биол 2006;(2):150–6.
14. Ben-Shahar S., Komlosch A., Nadav E. et al. 26 S proteasome-mediated production of an authentic major histocompatibility class I-restricted epitope from an intact protein substrate. J Biol Chem 1999;274(31):21963–72.
15. Gidehithlu K.P., Pegoraro A.A., Dunea G. et al. Degradation of albumin by renal proximal tubule cells and the subsequent fate of its fragments. Kidney Intern 2004;65:2113–22.
16. Doherty S.E., Ghosh N.S., Wright K.L. Loss of interferon-gamma inducibility of TAP1 and LMP2 in renal cell carcinoma cell line. Cancer Res 2000;60:5789–96.
17. Ghersi G. Roles of molecules involved in epithelial/mesenchymal transition during angiogenesis. Front Biosci 2008;1(13):2335–55.
18. Heaphy C.M., Griffith J.K., Bisoffi M. Mammary field cancerization: molecular evidence and clinical importance. Breast Cancer Res Treat 2009; 118(2):229–39.
19. Tan L., Fu X.Y., Li H.H. et al. Expression of p28GANK and its correlation with RB in human hepatocellular carcinoma. Liver Int 2005;25(3):667–6.