

АКТИВНОСТЬ ПРОТЕАСОМ И КАЛЬПАИНОВ ПРИ НОВООБРАЗОВАНИЯХ ЭНДОМЕТРИЯ

В.Д. Коваль, Л.В. Спирина, кандидат медицинских наук, **И.В. Кондакова**, доктор медицинских наук, профессор, **Л.А. Коломиец**, доктор медицинских наук, профессор, **О.В. Шpileва**

ФГБУ Научно-исследовательский институт онкологии СО РАМН, Томск

E-mail: koval@oncology.tomsk.ru

У больных с гиперпластическими процессами (ГЭ) и раком эндометрия (РЭ) I–II стадии определяли активность протеасом и кальпаинов, а также субъединичный состав протеасом в ткани РЭ. Установлено, что развитие РЭ связано с усилением внутриклеточного протеолиза и сопровождается изменением субъединичного состава протеасом в пользу иммунных форм. РЭ отличаются от ГЭ более высокой тотальной активностью протеасом, активностью 26S-пула протеасом и значительное повышение активности кальпаинов. Изменения активности протеасом и кальпаинов в ходе развития РЭ носят схожий характер и могут быть взаимосвязаны.

Ключевые слова: рак эндометрия, гиперпластические процессы эндометрия, химотрипсинподобная активность протеасом, активность кальпаинов

PROTEASOME AND CALPAIN ACTIVITIES IN ENDOMETRIAL HYPERPLASIA AND ENDOMETRIAL CANCER

V.D. Koval, L.V. Spirina, I.V. Kondakova, L.A. Kolomiets, O.V. Shpileva

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

In present study, we investigated the proteasome and calpain activities in patients with endometrial hyperplasia (EH) and endometrial cancer (EC), as well as proteasome subunit composition in EC tissue. EC development was shown to be associated with increased intracellular proteolysis and was accompanied by changes in proteasome subunit composition with predominance of the immune subunits. In EC tissue the total proteasome activity and the 26S proteasome pool activity were higher and calpain activity increased greatly if compared with EH. Changes in proteasome and calpain activities during EC development are similar in nature and are likely to be interrelated.

Key words: endometrial cancer, endometrial hyperplasia, chymotrypsin-like proteasome activity, calpain activity

ВВЕДЕНИЕ

Протеиназы играют важную роль в ключевых биологических процессах, участвуя в их инициации или регуляции. Активно исследуется их значение для возникновения и развития различных заболеваний, в частности, злокачественных новообразований.

Основным компонентом системы внутриклеточного протеолиза являются протеасомы, представленные различными формами: 26S-протеасомами, осуществляющими убиквитинзависимый протеолиз, и альтернативными формами, деградирующими малые, аномальные и коротко живущие белки. Детальное изучение протеасом в тканях опухолей носит не только фундаментальный характер, но может иметь значение и для терапии. Показаны связь их активности и наличия иммунных форм с радиорезистентностью, выходом опухоли из-под иммунного надзора и более выраженный терапевтический эффект ингибиторов иммунных протеасом по сравнению с неспецифическими ингибиторами протеасом [8, 13, 15].

Другой важной протеолитической системой является кальпаиновая. Субстратами для кальпаинов выступают некоторые онкобелки и продукты он-

косупрессоров. Кальпаины оказывают влияние на процессы пролиферации, апоптоза и миграции. В злокачественных клетках изменяются их активность и экспрессия, а повышенная экспрессия некоторых может влиять на восприимчивость клетки к противоопухолевой терапии [11, 14].

Практически не исследовано состояние этих протеолитических систем при раке эндометрия (РЭ). Изучение механизмов развития и прогрессирования новообразований эндометрия, поиск возможных молекулярных мишеней для воздействия необходимы в связи с тем, что несмотря на высокую общую выживаемость больных РЭ, высока и частота рецидивов, которые являются основной причиной смертности при данной патологии [2].

Целью исследования было изучение активности протеасом и кальпаинов, а также субъединичного состава протеасом при раке и гиперплазии эндометрия.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Проведение данной работы одобрено этическим комитетом НИИ онкологии СО РАМН. В исследование вошли больные с морфологически верифици-

рованными РЭ I–II стадии (n=30, средний возраст – 54±2,5 года). Согласно классификации FIGO (2009), Ia стадия заболевания была у 5 больных, Ib – у 20, II стадия – у 5. Также была сформирована группа пациентов с гиперпластическими процессами эндометрия (n=23; средний возраст – 50±3 года).

Материалом для исследования протеасом явились образцы опухолевой и гистологически неизменной ткани, взятой на расстоянии не менее 1 см от границы опухоли, полученные при выполнении радикального оперативного вмешательства, которые замораживали и хранили при температуре -80°C. Образцы гиперплазированного эндометрия получали при выполнении гистероскопии с биопсией или радикальной операции.

Получение осветленных гомогенатов. Замороженную ткань (100 мг) гомогенизировали в жидком азоте, затем ресуспендировали в 300 мкл 50 мМ трис-НСl буфера (pH=7,5), содержащего 2 мМ АТФ, 5 мМ хлорида магния, 1 мМ дитиотрейтола, 1мМ ЭДТА и 100 мМ хлорида натрия. Гомогенат центрифугировали 60 мин при 10 000 g и температуре 4°C.

Фракционирование протеасом проводили по методу Е.Б. Абрамовой и соавт. [1].

Определение активности протеасом. Химотрипсинподобную активность тотального пула протеасом, активность 26S пула и альтернативных форм протеасом определяли в осветленных гомогенатах опухолевых и неизменных тканей по гидролизу Suc-LLVY-АМС (Sigma), как описано ранее [6]. Удельную активность протеасом выражали в единицах активности на 1мг белка. Содержание белка определяли по методу Лоури.

Электрофорез. Электрофорез проводили по Laemmli в 13% полиакриламидном геле. Пробы наносили в буфере, содержащем 0,0625М трис-НСl (pH 6,8), 2% SDS, 5% 2-меркаптоэтанол, 10% глицерин, 0,01% бромфеноловый синий.

Вестерн-блоттинг. После электрофореза осуществляли перенос полипептидов на PVDF-мембрану (Immobilon, Millipore, США). Иммунодетекцию проводили согласно протоколу для «SNAP i.d.» (Millipore, США) с антителами к субъединицам $\alpha 1\alpha 2\alpha 3\alpha 5\alpha 6\alpha 7$, LMP7, Rpt6, LMP2 и PA28 β протеасом и к β -актину

(Santa Cruze, США). Затем мембрану подвергали обработке системой хемиллюминесцентной детекции ECL (GE Healthcare, Великобритания). Плотность полос оценивали с помощью компьютерной программы «ImageJ». Стандартизация проводилась относительно β -актина. Результаты выражали в процентах от содержания субъединиц протеасом в неизменной ткани.

Активность кальпаинов определяли в осветленных гомогенатах по гидролизу Suc-LLVY-АМС. Реакционная смесь содержала 100 мМ Tris-НСl (pH 7,3), 145 мМ NaCl, 1 мМ дитиотрейтола и 30 мкМ Suc-LLVY-АМС с добавлением 10 мМ CaCl₂ или без него с 30 мкМ ингибитора кальпаина I (Sigma) или ингибитора кальпаина IV (Calbiochem). Реакцию проводили в течение 30 мин при температуре 20°C. Образовавшийся продукт регистрировали на флюориметре «Hitachi-850» (Япония) при длине волны возбуждения 380 нм и эмиссии 440 нм. За единицу активности принимали количество фермента, при котором гидролизует 1 нмоль Suc-LLVY-АМС в течение 1 мин. Удельную активность кальпаинов выражали в единицах активности на 1мг белка.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ Statistica 8.0. Значимость различий исследовали с помощью критерия Манна–Уитни, корреляционный анализ проводили по Спирману.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного исследования выявлено усиление протеасомзависимого протеолиза в злокачественной ткани эндометрия по сравнению как с таковым в неизменной и гиперплазированной ткани (см. таблицу). Отмечено, что в ткани РЭ тотальная активность была выше, чем в неизменной, в 1,64 раза (p=0,03), а активность пула 26S – в 2,11 раза (p=0,03). По сравнению с ГЭ тотальная активность в ткани РЭ была выше в 2,27 раза (p=0,002), а пула альтернативных форм протеасом – в 1,39 раза (p=0,03).

Отметим, что данные о повышении активности протеасом в злокачественной ткани по сравнению с неизменной ранее были получены нами для рака эндометрия, молочной железы, плоскоклеточных карцином головы и шеи, в то время как при раке поч-

АКТИВНОСТЬ ПРОТЕАСОМ В ГИПЕРПЛАЗИРОВАННОМ, НЕИЗМЕНЕННОМ И ЗЛОКАЧЕСТВЕННОМ ЭНДОМЕТРИИ

Ткань	n	Тотальная активность, • 10 ³ Ед/мг		Активность пула 26S, • 10 ³ Ед/мг		Активность пула 20S, • 10 ³ Ед/мг	
		медиана	Q1; Q3	медиана	Q1; Q3	медиана	Q1; Q3
Гиперплазия	23	26,30*	8,81; 52,08	23,26	7,33; 33,30	48,40*	12,12; 81,67
Неизменная ткань больных РЭ	30	36,51*	12,58; 77,86	12,78*	6,39; 36,08	64,60	38,70; 97,09
Опухолевая ткань больных РЭ	30	59,65	28,42; 121,93	27,00	11,49; 50,74	67,29	41,67; 156,86

Примечание. Q₁ и Q₃ – соответственно нижний и верхний квартили; n – число больных; * – p<0,05 по сравнению с опухолевой тканью больных РЭ.

ки и мочевого пузыря этот показатель снижался или не изменялся [4, 6]. Такое разнонаправленное изменение подразумевает неодинаковую степень участия протеасомной системы и ее вовлеченность в различные механизмы при развитии опухолей указанных локализаций.

Увеличение активности протеасом в ткани РЭ по сравнению с неизмененными тканями и ГЭ, видимо, связано со значительным повышением интенсивности клеточных процессов, многие участники которых являются субстратами протеасом: белки – регуляторы клеточного цикла, рецепторы эстрогенов и прогестерона, компоненты системы инсулиноподобных факторов роста, многие транскрипционные факторы, белки pRb и p53, ингибитор NF-κB IκB, белки, контролирующие активность каспаз, компоненты сигнальных путей [9]. Соответственно, происходит и усиление аппарата деградации белков.

В результате исследования также выявлено изменение субъединичного состава протеасом в ткани РЭ (рис. 1). Наблюдалось снижение содержания α1α2α3α5α6α7-субъединиц протеасом на 41% по сравнению с неизмененной тканью. Отметим, что α1α2α3α5α6α7-субъединицы являются неотъемлемой составляющей любой формы протеасом, поэтому по их экспрессии можно судить о содержании тотального пула протеасом. Таким образом, в ткани РЭ происходит значительное уменьшение количества протеасом по сравнению с окружающей неизмененной тканью. Содержание в ней иммунных субъединиц, напротив, увеличилось: LMP2 – на 24,8%, LMP7 – на 27,6%. Столь значительное повышение при снижении общего количества протеасом свидетельствует об изменении функционирования протеасомной системы при РЭ и, видимо, играет важную роль в развитии опухоли. Трансформированная клетка может использовать эту перестройку как инструмент для регуляции критических для нее процессов – пролиферации, дифференцировки, апоптоза.

Содержание субъединицы регуляторного комплекса PA28β было на 24,5% выше в малигнизированной ткани, чем в соответствующей неизмененной. PA28 (11S) представляет собой комплекс из субъединиц PA28α и PA28β; он активирует пептидазную активность протеасомы, увеличивая эффективность гидролиза некоторых пептидов в 100 раз, при этом не оказывая влияния на деградацию свернутых или крупных белков [5]. Видимо, повышение активности протеасом в опухоли связано с увеличением экспрессии субъединиц этой регуляторной частицы.

Содержание субъединицы Rpt6 в ткани РЭ было на том же уровне, что и в соответствующей неизмененной ткани. Rpt6 представляет собой одну из АТФазных субъединиц 19S-регуляторной частицы (PA700) 26S-протеасомы. Зарегистрированная экспрессия Rpt6 в сочетании с резким уменьшением α1α2α3α5α6α7 (коэффициент корреляции между этими показате-

лями $r=0,44$; $p=0,04$) позволяет предполагать относительное увеличение содержания 19S-регуляторов – единственного типа активаторов протеасом, ответственных за убиквитин- и АТФ-зависимый протеолиз. Этот вывод подтверждается фактом двукратного повышения активности 26S-пула протеасом, образованных путем ассоциации 19S-регуляторной частицы с 20S-ядром, в ткани РЭ по сравнению с соответствующей неизмененной тканью. Вероятно, малигнизированную ткань от окружающей отличает усиленный убиквитинзависимый протеолиз.

Активность кальпаинов в ткани РЭ не отличалась от таковой в неизмененной ткани, но была в 11,77 раза выше, чем при ГЭ ($p=0,000$). Полученные результаты согласуются с данными N. Carragher и соавт. [7] о повышении активности кальпаинов при трансформации клеток в клеточных культурах и позволяют сделать вывод о преимущественном участии кальпаинов в процессах, происходящих только в злокачественных и прилегающих к ним тканях. По мнению многих авторов, к последним главным образом относятся нарушение межклеточной адгезии, перестройка актинового цитоскелета, морфологическая трансформация и клеточная миграция, поскольку кальпаины деградируют многие сигнальные и структурные белки [3, 10].

При анализе особенностей изменения химотрипсинподобной активности протеасом и активности кальпаинов в опухолях эндометрия в зависимости от стадии заболевания выявлена выраженная тенденция

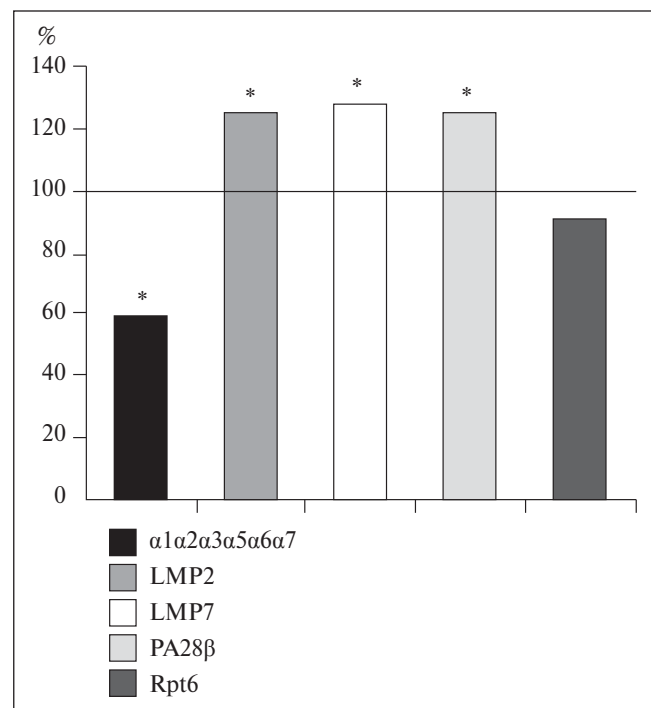


Рис. 1. Субъединичный состав протеасом в ткани РЭ по сравнению с содержанием в неизмененной ткани, принятым за 100% * – $p < 0,05$

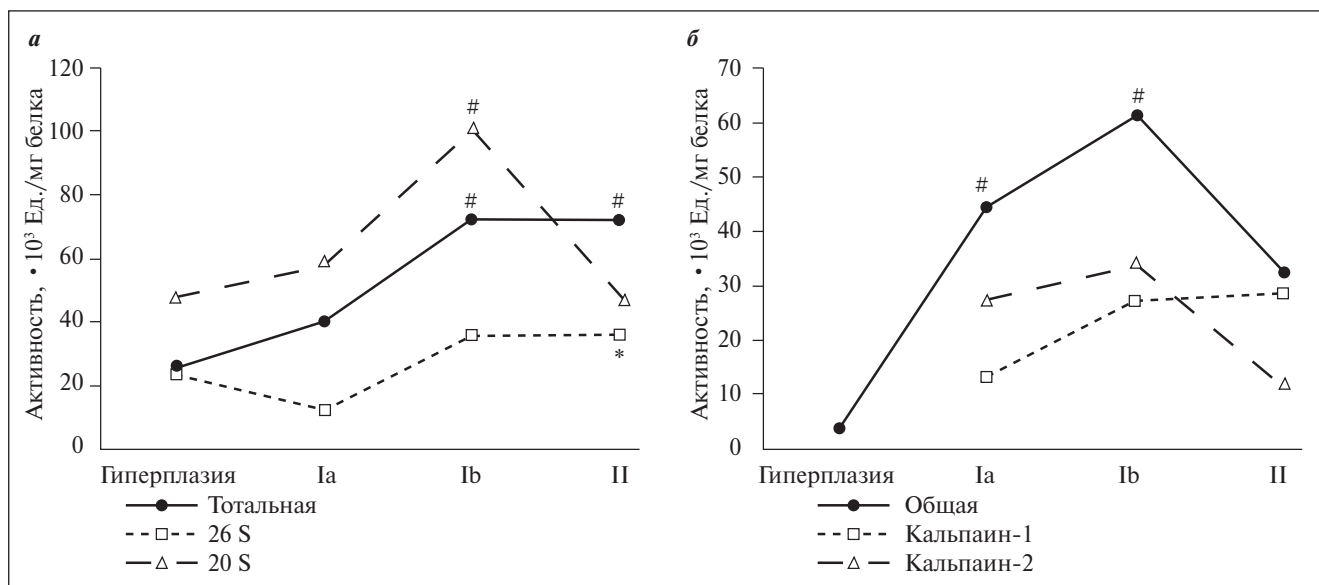


Рис. 2. Активность протеиназ при гиперпластических процессах и РЭ в зависимости от стадии: а – активность протеасом, б – активность кальпаинов; * – $p < 0,05$ по сравнению со стадией Ia РЭ; # – $p \leq 0,01$ по сравнению с гиперплазией эндометрия

к их повышению при увеличении глубины инвазии в миометрий (рис. 2). При распространении опухоли на строму шейки матки (стадия II) наблюдали снижение активности протеаз или значения, характерные для стадии Ib. Таким образом, резкое усиление специфического внутриклеточного протеолиза при РЭ происходит на начальных этапах заболевания. Считается, что протеазы взаимодействуют друг с другом и образуют сеть, которая представлена ферментами различных каталитических типов и обеспечивает эффективный протеолиз в ходе опухолевой прогрессии [12]. Сходный характер изменений активности протеасом и кальпаинов в развитии РЭ, видимо, связан с взаимодействием протеаз в процессе опухолевой прогрессии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом полученные данные указывают на то, что развитие злокачественных опухолей сопряжено с существенным изменением активности протеасом и кальпаинов. Дальнейшее изучение может стать основой для разработки новых дополнительных критериев прогноза течения опухолей эндометрия и поиска эффективных противоопухолевых средств при молекулярно-направленной терапии.

Работа выполнена при поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 гг.» (государственный контракт П320).

ЛИТЕРАТУРА

1. Абрамова Е.Б., Астахова Т.М., Ерохов П.А. и др. Множественность форм протеасомы и некоторые подходы к их разделению // Изв. РАН. Серия Биол. – 2006; 2: 150–6.
2. Бочкарева Н.В., Коломиец Л.А., Чернышова А.Л. Нужна ли метаболическая реабилитация больным с гиперпластическими процессами и раком эндометрия на фоне метаболического синдрома? // Сибирский онкол. журн. – 2010; 41 (5): 71–7.
3. Бочкарева Н.В., Кондакова И.В., Коломиец Л.А. Роль актинсвязывающих белков в клеточном движении в норме и при опухолевом росте // Молекул. мед. – 2011; 6: 14–8.
4. Кондакова И.В., Спирина Л.В., Шашова Е.Е. и др. Активность протеасом в опухолях женской репродуктивной системы // Биоорган. химия. – 2012; 38 (1): 106–11.
5. Сорокин А.В., Ким Е.Р., Овчинников Л.П. Протеасомная система деградации и процессинга белков // Успехи биол. химии. – 2009; 49: 3–76.
6. Спирина Л.В., Кондакова И.В., Усынин Е.А. Активность протеасом в злокачественных опухолях различных локализаций // Сибирский онкол. журн. – 2009; 5: 49–52.
7. Carragher N., Fonseca B., Frame M. Calpain Activity Is Generally Elevated during Transformation but Has Oncogene-Specific Biological Functions // Neoplasia. – 2004; 6 (1): 53–73.
8. Donna L., Lagadec C., Pajonk F. Radioresistance of prostate cancer cells with low proteasome activity // Prostate. – 2011; Doi: 10.1002/pros.21489.
9. Driscoll J., Minter A., Driscoll D. et al. The ubiquitin+proteasome protein degradation pathway as a therapeutic strategy in the treatment of solid tumor malignancies // Anticancer Agents Med. Chem. – 2011; 11 (2): 242–6.
10. Le Devedec S., Yan K., de Bont H. et al. Systems microscopy approaches to understand cancer cell migration and metastasis // Cell. Mol. Life Sci. – 2010; 67: 3219–40.
11. Niapour M., Farr C., Minden M. et al. Elevated calpain activity in acute myelogenous leukemia correlates with decreased calpastatin expression // Blood. Cancer J. – 2012; 2, e51. Doi: 10.1038/bcj.2011.50.
12. Rothberg J., Sameni M., Moin K. et al. Live-cell imaging of tumor proteolysis: Impact of cellular and non-cellular microenvironment // Biochim et Biophys. Acta. – 2012; 1824: 123–32.
13. Singh A., Bandi M., Aujay M. et al. PR-924, a Selective Inhibitor of the Immunoproteasome Subunit LMP-7, Blocks Multiple Myeloma Cell Growth both in vitro and in vivo // Br. J. Haematol. – 2011; 152 (2): 155–63.
14. Storr S., Carragher N., Frame M. et al. The calpain system and cancer // Nature Reviews Cancer. – 2011; 11: 364–74.
15. Wu T., Schreiber K., Arina A. et al. Progression of cancer from indolent to aggressive despite antigen retention and increased expression of interferon-gamma inducible genes // Can. Immun. – 2011; 11: 2.