

Активность протеасом и их субъединичный состав при гиперпластических процессах и раке эндометрия

Л.В. Спирина¹, И.В. Кондакова¹, Л.А. Коломиец¹, А.Л. Чернышова¹,
О.Н. Асадчикова¹, Н.П. Шарова², В.Д. Коваль¹

¹НИИ онкологии Томского научного центра СО РАМН;

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

Контакты: Людмила Викторовна Спирина SpirinaLV@oncology.tomsk.ru

При гиперпластических процессах эндометрия изменения тотальной активности протеасом не зарегистрировано, однако происходит увеличение активности пула 26S протеасом по сравнению с таковой при нормальном эпителии. Развитие рака эндометрия связано с повышением тотальной активности протеасом и активности пулов 26S и 20S протеасом. Изменение активности протеасом связано со снижением экспрессии $\alpha 1a2a3a5a6a7$ -субъединиц протеасом и увеличением содержания LMP2, LMP7 и PA28 β -субъединиц протеасом по сравнению с этими показателями при неизменной ткани эндометрия. Наблюдалось снижение содержания субъединиц протеасом $\alpha 1a2a3a5a6a7$ при II стадии злокачественного процесса по сравнению с их количеством при I стадии.

Ключевые слова: рак эндометрия, гиперпластические процессы эндометрия, активность протеасом, субъединичный состав

Proteasome activity and subunit composition in endometrial hyperplasia and cancer

L.V. Spirina¹, I.V. Kondakova¹, L.A. Kolomiets¹, A.L. Chernysova¹,
O.N. Asadchikova¹, N.P. Sharova², V.D. Koval¹

¹Cancer Research Institute, Tomsk Scientific Centre, SB RAMS;

²N.K. Koltzov Institute of Developmental Biology RAS, Moscow

In endometrial hyperplasia the total proteasome activity was not changed however the 26S proteasome activity was increased in comparison with the normal tissues. In endometrial cancer the high total proteasome activity and activities of 26S and 20S proteasomes were revealed. The changes in proteasome activities were correlated with the decreased content of $\alpha 1a2a3a5a6a7$ proteasome subunits and increased contents of LMP2, LMP7 and PA28 β proteasome subunits compared to that in nonaltered tissues. Low content of $\alpha 1a2a3a5a6a7$ proteasome subunits was revealed at the second stage of cancer patients in comparison with that at the first stage.

Key words: endometrial hyperplasia, endometrial cancer, proteasome activity, proteasome subunit

Введение

Гиперплазию эндометрия рассматривают в качестве одного из факторов риска развития рака эндометрия (РЭ) [1, 2]. В возникновении этих патологических процессов большое значение имеют как системные нарушения гормонального обмена в организме в целом, так и местные изменения тканевого метаболизма органа-мишени. На локальном уровне одним из основных механизмов регуляции опухолевого роста является комплекс протеаз, их ингибиторов, активаторов и рецепторов, принимающих участие в метастазировании и инвазивном росте злокачественных клеток [3, 4].

Ферменты внутриклеточной деградации белков — протеасомы — играют значительную роль в онкогенезе. Они представлены 2 пулами: 26S и 20S. Пул 26S протеасом осуществляет специфическую деградацию белков и пептидов в клетке. Протеасомы 20S разрушают аномальные и короткоживущие пептиды [5, 6]. Субъединичный состав протеасом также имеет большое значение. Выявлено, что в процессе канцерогене-

за происходит замена конститутивных субъединиц протеасом на иммунные (LMP2, LMP7, PA28 β) с изменением активности мультикаталитического ферментативного комплекса [7, 8].

При развитии РЭ зарегистрировано изменение тотальной активности протеасом [9]. Кроме того, в экспериментальных условиях показана апоптотическая гибель раковых клеток эндометрия при применении ингибитора протеасом бортезомиба [10]. Однако данных об активности протеасом, пулов 26S и 20S протеасом и их субъединичном составе при гиперпластических процессах и РЭ недостаточно.

Цель исследования — сравнительное изучение активности протеасом и их субъединичного состава в нормальной, гиперплазированной и злокачественной тканях эндометрия.

Материалы и методы

В соответствии с Международной классификацией морфологического состояния эндометрия, основанного на структурных и цитологических изменениях

(ВОЗ, 1994) и Международной классификацией РЭ FIGO (ВОЗ, 1992) и TNM (ВОЗ, 1998) были сформированы 3 клинические группы. Первую группу составили 33 пациентки с морфологически верифицированным диагнозом РЭ I–II стадии (средний возраст $57,6 \pm 2,0$ года). У 26 пациенток была верифицирована I стадия заболевания и у 7 — II. Объемы диагностики и лечения больных РЭ соответствовали рекомендуемым алгоритмам объемов диагностики и лечения злокачественных новообразований, утвержденных Министерством здравоохранения и социального развития РФ. Во 2-ю группу вошли 16 пациенток с гиперпластическими процессами эндометрия (средний возраст $52,6 \pm 9,6$ года). Все больные с гиперпластическими процессами в эндометрии получали либо гормональное, либо хирургическое органосохраняющее лечение. Третья группа была представлена 6 пациентками, не имевшими патологии эндометрия (средний возраст $50,0 \pm 1,2$ года). Материал исследования составили послеоперационные образцы ткани эндометрия. В случае РЭ материалом исследования были опухолевая и гистологически неизменная ткани, находящиеся 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-НСl-буфера (pH = 7,5), содержащего 2 мМ АТФ, 5 мМ хлорида магния, 1 мМ дитиотреитола, 1 мМ ЭДТА и 100 мМ хлорида натрия. Гомогенат центрифугировали 60 мин при 10 000 g и температуре 4°C .

Фракционирование протеасом. Все процедуры проводили 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 [11].

Определение активности протеасом. Активность тотального пула протеасом, содержащего формы 26S и 20S, определяли в осветленных гомогенатах опухолевых и неизменных тканей по гидролизу флуорогенного олигопептида Suc-LLVY-AMC, утилизирующегося химотрипсиноподобными центрами протеасом [12]. Реакционная смесь для определения активности тотального пула протеасом и пула 26S протеасом содержала 20 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 1 мМ дитиотреитола, 30 мкМ Suc-LLVY-AMC, 5 мМ MgCl_2 и 1 мМ АТФ. Реакционная смесь для определения активности пула 20S протеасом имела такой же состав за исключением 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 гидролизуются 1 нмоль Suc-LLVY-AMC в течение 1 мин. Удельную активность протеасом выражали в единицах активности на 1 мг белка. Содержание белка устанавливали по методу Лоури.

Электрофорез. Электрофорез проводили по Laemmli в 13 % полиакриламидном геле. Пробы наносили в буфере, содержащем 0,0625 М трис-НСl (pH 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-HCl (pH 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, Rpt6 и поликлональные антитела к субъединицам LMP2 и P A28 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 неизменной ткани, где за 100 % брали содержание субъединиц протеасом в неизменной 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 были представлены как $m \pm M$, где m — среднее выборочное, M — ошибка среднего.

Результаты и обсуждение

В ходе проведенного исследования было выявлено, что химотрипсиноподобная тотальная активность протеасом связана с прогрессией патологии эндометрия (табл. 1). При развитии гиперплазии эндометрия происходит увеличение активности 26S протеасом в 1,8 раза по сравнению с таковой при нормальном эндометрии без атипии. В ткани РЭ наблюдалось увеличение тотальной активности протеасом в 4,4, активности пула 26S протеасом — в 2,9 и пула 20S протеасом — в 3,2 раза в сравнении с этими показателями в нормальной ткани. Вероятно, при увеличенной про-

Таблица 1. Активность протеасом в нормальной, гиперплазированной и злокачественной тканях эндометрия

Ткань	Число больных	Тотальная активность протеасом, $\times 10^3$ Ед/мг белка	Активность пула 26S, $\times 10^3$ Ед/мг белка	Активность пула 20S, $\times 10^3$ Ед/мг белка
Нормальный эндометрий	6	34,7 $\pm$ 4,4	12,2 $\pm$ 2,1	28,7 $\pm$ 2,0
Гиперплазия эндометрия	15	44,2 $\pm$ 7,0	29,4 $\pm$ 3,5*	42,1 $\pm$ 4,6
Неизменная ткань больных РЭ	31	50,2 $\pm$ 5,3	22,2 $\pm$ 2,2*	43,0 $\pm$ 4,7
Опухолевая ткань больных РЭ	33	151,5 $\pm$ 29,6*, **, ***	36,2 $\pm$ 6,0*, ***	93,8 $\pm$ 5,4*, **, ***

* Значимость различий по сравнению с нормальной тканью эндометрия ($p < 0,05$);

** значимость различий по сравнению с гиперплазией эндометрия ($p < 0,05$);

*** значимость различий по сравнению с неизменной тканью больных РЭ ($p < 0,05$).

Таблица 2. Субъединичный состав протеасом в ткани больных РЭ

Показатель	Число больных	Процентное содержание по сравнению с неизменной тканью
$\alpha 1\alpha 2\alpha 3\alpha 4\alpha 5\alpha 6\alpha 7$	27	79,9 $\pm$ 5,1*
LMP7	27	149,0 $\pm$ 12,3*
LMP2	27	191,6 $\pm$ 22,5*
PA28B	27	133,7 $\pm$ 11,5*
Rpt6	27	124,6 $\pm$ 13,0

* Значимость различий по сравнению с неизменной тканью больных РЭ ($p < 0,05$).

лиферации в гиперплазированном и малигнизированном эпителии эндометрия происходит активация и накопление метаболически активных веществ и ростовых факторов, что приводит, в свою очередь, к усилению процессов их деградации.

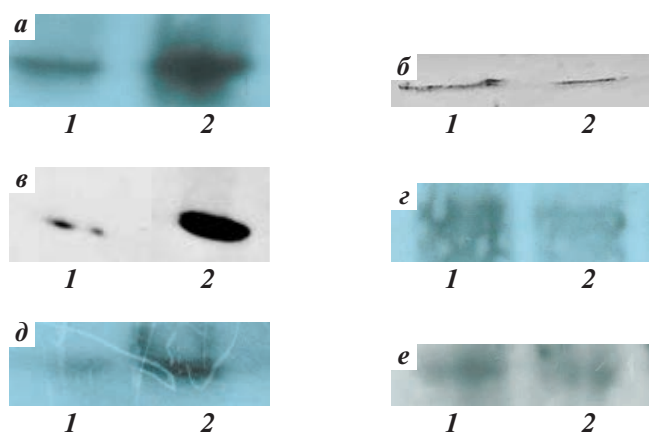
Окружающая неизменная ткань больных РЭ также претерпевает изменения. В ней отмечается увеличение химотрипсиноподобной активности 26S-протеасом в 2,2 раза по сравнению с таковой в группе пациенток, не имевших патологии эндометрия. Известно, что в процессе канцерогенеза нормальная окружающая ткань начинает приобретать молекулярно-генетические свойства, способствующие прогрессии и росту опухоли [13, 14]. Вероятно, увеличение активности 26S-протеасом является важным показателем, характеризующим функциональную активность ткани.

Таким образом, при РЭ наблюдалось изменение тотальной активности протеасом и активности пула 20S протеасом по сравнению с данными показателями при гиперплазии. Установлено, что тотальная активность

и активность пула 20S увеличивались в 3,4 и 2,2 раза соответственно по сравнению с активностью ферментов при гиперплазии. Полученные данные еще раз подтверждают факт усиления протеолиза при малигнизации эндометрия.

Известно, что изменения в активности протеасомной системы внутриклеточной деградации белков связаны с ее субъединичным составом [15]. Содержание субъединиц $\alpha 1\alpha 2\alpha 3\alpha 5\alpha 6\alpha 7$, Rpt6, PA28B и иммунных субъединиц LMP2, LMP7 исследовали с помощью вестерн-блоттинга с применением специфических антител (см. рисунок). При изучении субъединичного состава протеасом в ткани РЭ обнаружено снижение содержания $\alpha 1\alpha 2\alpha 3\alpha 5\alpha 6\alpha 7$ -субъединиц протеасом в ткани опухоли на 20,1 % и увеличение содержания PA28B на 33,7 % по сравнению с неизменной тканью, в то время как содержание АТФ-зависимой субъединицы протеасом Rpt6 достоверно не изменялось (табл. 2). Содержание иммунных субъединиц протеасом LMP7 увеличивалось на 49 %, LMP2 — на 91 % в опухолевой ткани по сравнению с их концентрацией в неизменной окружающей ткани. Установлено, что появление в составе протеасом иммунных субъединиц приводит к увеличению активности ферментов [7]. Вероятно, увеличение содержания в составе протеасом исследованных нами иммунных субъединиц связано с повышением активности протеасом и их пулов.

При изучении показателей внутриклеточного протеолиза в группах больных в зависимости от стадии заболевания выявлено снижение экспрессии $\alpha 1\alpha 2\alpha 3\alpha 5\alpha 6\alpha 7$ -субъединиц протеасом в ткани опухоли пациенток со II стадией заболевания на 18,7 % по сравнению с таковым у больных I стадии (63,0 $\pm$ 8,8 %). Обнаруженная связь содержания конститутивных протеасом со стадией заболевания имеет важное практическое значение и требует проведения дальнейших исследований.



Экспрессия субъединиц протеасом в опухоли (1) и неизменной (2) ткани при РЭ: а – экспрессия $\alpha 1\alpha 2\alpha 3\alpha 5\alpha 6\alpha 7$; б – LMP7; в – LMP2; г – PA28 β ; д – Rpt6; е – β -актина

Таким образом, активность протеасом ассоциирована с патологическими изменениями в ткани РЭ. При наличии гиперплазии эндометрия происходит увеличение активности пула 26S протеасом, осуществляющего энергозависимый специфический гидролиз белков, что свидетельствует о формировании дисба-

ланса внутриклеточного протеолиза. Развитие РЭ связано с повышением тотальной активности протеасом, пулов 26S и 20S протеасом. Возрастание роли пула 20S протеасом при злокачественных процессах, характеризующихся высокой интенсивностью метаболических и пролиферативных процессов, вероятно, обусловлено необходимостью расщепления таких короткоживущих молекул, как регуляторы клеточного цикла, апоптоза и др. Изменение активности протеасом связано со снижением экспрессии $\alpha 1\alpha 2\alpha 3\alpha 5\alpha 6\alpha 7$ -субъединиц и увеличением содержания LMP2, LMP7 и PA28 β -субъединиц протеасом.

Выводы

Полученные данные свидетельствуют об особенностях функционирования протеасом в гиперплазированном и малигнизированном эндометрии с наибольшей степенью выраженности изменений в ткани злокачественных опухолей. Таким образом, протеасомы играют важную роль в патогенезе гиперпластических процессов и РЭ, и в дальнейшем их можно рассматривать в качестве возможных молекулярных маркеров злокачественного процесса и мишеней для таргетной терапии опухолей данной локализации.

ЛИТЕРАТУРА

- Чепик О.Ф. Морфогенез гиперпластических процессов эндометрия. *Практ онкол* 2004;5(1):9–15.
- Lacey J.V.Jr., Sherman M.E., Ronnet B.M. et al. Absolute risk of endometrial carcinoma during 20-year follow-up among women with endometrial hyperplasia. *J Clin Oncol* 2010; 28(5):788–92.
- Спирина Л.В., Кондакова И.В. Роль внутриклеточного специфического протеолиза в онкогенезе. *Вопр онкол* 2008; (6):690–4.
- Sharova N., Zakharova L. Multiple forms of proteasomes and their role in tumor fate. *Recent patents on endocrine. Metabol Immun Drug Discov* 2008;2(3):152–61.
- Ротанова Т.В., Мельников Э.Э. АТР-зависимые протеиназы и протеолитические комплексы внутриклеточной деградации белков. *Биомед химия* 2008;54(5):512–30.
- Emmerich N.P.N., Nussbaum A.K., Stevanovic S. et al. The human 26S and 20S proteasomes generate overlapping but different sets of peptide fragments from a model protein substrate. *J Biol Chem* 2000;275:21140–8.
- Almond J.B., Cohen G.M. The proteasome; a novel target for cancer chemotherapy. *Leukemia* 2002;16:433–43.
- Fuchs D., Berges C., Opelz G. et al. Increased expression and altered subunit composition of proteasomes induced by continuous proteasome inhibition establish apoptosis resistance and hyperproliferation of Burkitt lymphoma cells. *J Cell Biochem* 2008;103(1):270–83.
- 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.
- Dolcet X., Llobet D., Encinas M. et al. Proteasome inhibitors induce death but activate NF- κ B on endometrial carcinoma cell lines and primary culture explants. *J Biol Chemistry* 2006;281:22118–30.
- 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.
- Ben-Shahar S., Komlos 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;274(31):21963–72.
- Gherzi G. Roles of molecules involved in epithelial/mesenchymal transition during angiogenesis. *Front Biosci* 2008;13(13):2335–55.
- 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.
- Arlt A., Bauer I., Schafmayer C. et al. Increased proteasome subunit protein expression and proteasome activity in colon cancer relate to an enhanced activation of nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2). *Oncogene* 2009;28:3983–96.