

УДК 577.152.34

Изменение пула протеасом в процессе злокачественной трансформации клеток печени мыши

Т.М. Астахова, Г.В. Делоне, Ю.В. Люпина, Е.Б. Абрамова, И.В. Урываева, Н.П. Шарова*
 Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 26
 *E-mail: npsharova@bk.ru

РЕФЕРАТ Множественные формы протеасом регулируют клеточные процессы, устраняя белки или образуя пептиды, в этих процессах участвующие. Можно полагать, что различные патологии, в т.ч. злокачественная трансформация клеток, связаны с изменениями функционирования множественных форм протеасом. В настоящей работе исследованы изменения в пуле протеасом печени при регенераторной узелковой гиперплазии гепатоцитов и образовании на ее фоне аденомы и гепатоклеточной карциномы у мышей, подвергнутых действию дипина и последующей операции частичной гепатэктомии. Относительное содержание различных форм протеасом изучали с помощью Вестерн-блоттинга. Химотрипсинподобную активность протеасом оценивали по гидролизу флуорогенного коммерческого субстрата Suc-LLVY-AMC. Выявлено, что изменения в пуле протеасом начинаются уже при формировании диффузных узелков и заключаются в возрастании экспрессии конститутивной субъединицы X(β 5) и иммунных субъединиц LMP7(β 5i) и LMP2(β 1i), что сопровождается увеличением тотального пула протеасом и падением его химотрипсинподобной активности. Эти изменения были более выраженными при образовании гепатоклеточной карциномы. Аденома занимала промежуточное положение между образцами печени с диффузными узелками и гепатоклеточной карциномой по изменению химотрипсинподобной активности и содержания тотального пула протеасом и субъединицы LMP2(β 1i). Помимо этого, образование злокачественной опухоли было связано с повышением уровня субъединицы Rpt6, входящей в состав 19S-активатора протеасом. Полученные результаты дают основание полагать, что регенераторная узелковая гиперплазия печени и аденоматоз являются этапами, предшествующими образованию гепатоклеточной карциномы. Кроме того, полученные результаты ставят задачу поиска сигнальных путей, приводящих к изменению экспрессии субъединиц протеасом при злокачественной трансформации клеток. Проведенная работа указывает на перспективность использования 19S-активатора протеасом, избыточно экспрессирующегося в злокачественной опухоли, в качестве мишени для разработки новых противоопухолевых лекарств.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА иммунные протеасомы, 19S-активатор протеасом, химотрипсинподобная активность протеасом, Вестерн-блоттинг, регенераторная узелковая гиперплазия гепатоцитов, аденома, гепатоклеточная карцинома, печень мыши.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ХТП-активность, химотрипсинподобная активность; nNOS, нейрональная NO-синтаза; дипин, 1,4-бис-[N,N'-ди(Этилен)-фосфамид] пиперазин; Suc-LLVY-AMC, N-succinyl-leu-leu-val-tyr7-amido-4-methyl coumarin; MG132, Z-leucyl-leucyl-leucinal; mAb, моноклональные антитела; pAb, поликлональные антитела.

ВВЕДЕНИЕ

Изучение молекулярных механизмов злокачественной трансформации клеток по сей день остается одной из наиболее актуальных проблем. Открытие в 80-х годах прошлого века новой системы гидролиза белков, связанной с протеасомами и затрагивающей все клеточные процессы, выявило дополнительные перспективы в исследовании механизмов злокачественной трансформации клеток млекопитающих. Протеасомы, мультисубъединичные мультипротеиназные белковые комплексы, присутствуют в органах и тканях млекопитающих во множественных формах, различающихся структурой и физиологической ролью [1–4]. По набору протеолитически активных субъединиц все многообразие этих форм можно свести к двум группам – конститутивным и иммунным протеасомам. В состав конститутивных протеасом входят по две субъединицы X(β 5),

Y(β 1) и Z(β 2), проявляющие, соответственно, химотрипсин-, каспаза- и трипсинподобную активности. При сборке иммунных протеасом в их структуру встраиваются иммунные субъединицы LMP7(β 5i), LMP2(β 1i) и LMP10(β 2i) вместо перечисленных протеолитических субъединиц конститутивных протеасом. В процессе гидролиза чужеродных белков иммунными протеасомами образуется в несколько раз больше антигенных эпитопов, способных встраиваться в щель Бюркмана молекул главного комплекса гистосовместимости класса I для последующего их представления T-лимфоцитам. Кроме того, иммунные протеасомы участвуют в регуляции дифференцировки и пролиферации некоторых клеточных популяций, вероятно, за счет продуцирования биологически активных пептидов [5, 6] и представляют собой необходимое звено сигнального пути, гасящего окислительный стресс [7].

Как конститутивные, так и иммунные протеасомы образуют пулы 26S- и 20S-протеасом [3]. 26S-протеасомы состоят из протеолитической субчастицы 20S и одной или двух 19S-субчастиц-активаторов, осуществляющих связывание с убиквитинированными белками-мишенями, их расплетание и проталкивание в протеолитическую камеру. Таким образом, 26S-протеасомы регулируют клеточные процессы, устраняя белки или образуя пептиды, участвующие в этих процессах, и запускают реакции, связанные с Т-клеточным звеном иммунитета. Функционирование 26S-протеасом, как правило, зависит от АТФ и убиквитина. 20S-протеасомы, напротив, расщепляют белки и короткие пептиды независимо от АТФ и убиквитина. С каждым годом увеличивается список обнаруженных белков-субстратов 20S-протеасом. К ним относятся, например, белки с поврежденной третичной структурой [8], ряд вирусных белков [9, 10].

Учитывая многообразие функций протеасом, можно говорить о важности выявления изменений, происходящих в пуле протеасом при злокачественной трансформации клеток, как для понимания механизмов этого процесса, так и для поиска новых мишеней противоопухолевой терапии среди множественных форм протеасом. Немногочисленные литературные данные, связанные с этим вопросом, касаются сравнения содержания той или иной формы протеасом в злокачественных и контрольных клетках [11–16]. В то же время понимание особенностей функционирования пула протеасом на этапах образования доброкачественной и злокачественной опухолей могло бы прояснить некоторые механизмы перехода клеток в состояние злокачественности. Поэтому целью настоящей работы было выявить изменения, затрагивающие пул протеасом при образовании доброкачественных и злокачественных опухолей, на одной и той же модели животных. Для исследования была выбрана разработанная ранее модель индуцирования злокачественной трансформации клеток печени у мышей CBA/Lac x BL/6 F1 под действием алкилирующего препарата дипина и последующей операции частичной резекции печени [17, 18]. Дипин вызывает в гепатоцитах нерепарируемые повреждения генетического материала, которые после стимуляции митозов частичной резекцией печени приводят к хромосомным разрывам и перестройкам. Клетки, несущие такие повреждения, оказываются нежизнеспособными и постепенно гибнут. Восстановление паренхимы происходит за счет активации тканевого стволового резерва и клонального роста новообразованных гепатоклеточных узелков, которые, сливаясь и вытесняя исходные дегенерирующие гепатоциты, формируют новую ткань. Этот процесс узелковой регенераторной гиперплазии носит диффузный характер, но со временем единичные узелки могут прогрессировать и дать начало образованию крупных аденом и гепатокарцином. В настоящей работе проведено сравнительное исследование ХТП-активности и содержания тотального пула протеасом, а также содержания 26S- и иммунных протеасом в интактной печени и индуцированных печеночных доброкачественных и злокачественных опухолях.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы. В работе использованы Suc-LLVY-AMC и MG132 фирмы Sigma (США), mAb мыши к β -актину

фирмы Santa Cruz (Германия), mAb мыши к субъединицам Rpt6 и $\alpha 1,2,3,5,6,7$, pAb кролика к субъединицам X($\beta 5$), LMP7($\beta 5i$) и LMP2($\beta 1i$) фирмы Biomol (Великобритания), pAb кролика к nNOS фирмы Abcam (Великобритания). Набор ECL, нитроцеллюлозные мембраны Hybond-ECL и антитела к IgG мыши и кролика, конъюгированные с пероксидазой, получены от фирмы Amersham Biosciences (Великобритания).

Животные. Исследование выполняли на мышах CBA/Lac x BL/6 F1. Группе самцов весом 20–22 г в возрасте трех месяцев вводили дипин из расчета 60 мкг на 1 г веса и проводили стандартную операцию частичной резекции печени (до 70 %) согласно разработанной ранее схеме [17]. В качестве контрольных групп животных использовали мышей с интактной печенью и мышей, подвергнутых операции частичной резекции печени. Через 12 мес. исследовали печень контрольных и опытных животных.

Гистологическое исследование печени. Фрагменты печени и крупных опухолевых узлов фиксировали в 10 %-ном формалине. Фиксированный материал проводили по стандартной методике, заливали в парафин и готовили срезы толщиной 5 мкм. После депарафинирования препараты окрашивали гематоксилин-эозином, заключали в бальзам и анализировали с помощью светового микроскопа Olympus АНВТЗ (Австрия).

Получение осветленных гомогенатов фрагментов печени и опухолей. Все процедуры проводили при 0–4 °С. Фрагменты печени и опухоли промывали стандартным фосфатным солевым буфером, обсушивали, взвешивали и гомогенизировали в гомогенизаторе (стекло-стекло) (Braun Melsungen, Германия) в буфере, содержащем 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM дитиотреитол, 10 %-ный глицерин, 5 mM MgCl₂, 1 mM АТФ, 10 mM Na₂S₂O₅, лейпептин (0.5 мкг/мл), пепстатин (1 мкг/мл) и апротинин (1 мкг/мл), в соотношении 1 : 3. Гомогенаты центрифугировали при 10 000g в течение 30 мин. Надосадочную жидкость (осветленные гомогенаты) использовали для дальнейших исследований. Концентрацию белка в осветленных гомогенатах определяли по методу Лоури [19].

Определение активности протеасом. Активность протеасом определяли по гидролизу флуорогенного олигопептида Suc-LLVY-AMC, утилизирующегося ХТП-центрами протеасом [20]. Реакционная смесь содержала 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM дитиотреитол, 30 мкМ Suc-LLVY-AMC, 5 mM MgCl₂ и 1 mM АТФ. Для исключения вклада примесных протеолитических активностей в ряд проб добавляли 10 мкМ MG132, ингибитор ХТП-центров протеасом. Реакцию проводили при 37 °С в течение 20 мин после внесения 0.5–2 мкл осветленного гомогената в реакционную смесь (до 100 мкл конечного объема) и останавливали 1 %-ным Ds-Na. Образовавшийся продукт регистрировали на флуориметре при значениях возбуждающей длины волны 380 нм и эмиссии 440 нм. Окончательные расчеты проводили по разнице между полной и остаточной активностями в присутствии MG132. Активность выражали в нмоль Suc-LLVY-AMC, гидролизованного протеасомами, содержащимися в 100 мкл осветленных гомогенатов, в течение 20 мин.

Вестерн-блоттинг. Относительное содержание субъединиц протеасом, nNOS и β -актина в осветленных гомо-

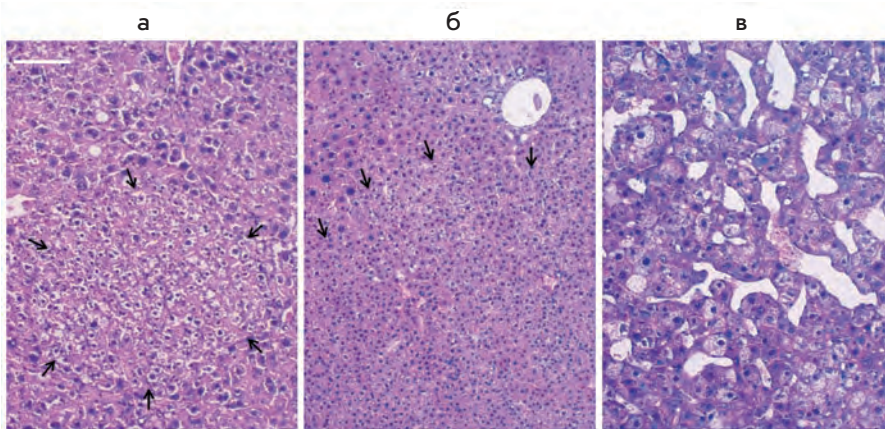


Рис. 1. Гепатоклеточные опухоли, развившиеся на фоне хронического регенеративного состояния печени через 12 мес. после воздействия дипина и частичной гепатэктомии: а – узелок-микроаденома, состоящий из мелких гепатоцитов с диплоидными ядрами; б – крупная гепатоклеточная аденома, в которой отсутствует типичная для печени структура долек и сосудистого русла; в – гепатоклеточная карцинома трабекулярного типа с цитомегалией, аномальным строением трабекул и синусоидов. Окраска гематоксилин-эозином. Стрелками указаны границы опухолей. Шкала 100 мкм

генах определяли с помощью Вестерн-блоттинга. После электрофореза белков осветленных гомогенатов (по 5 мкл на дорожку, 120–148 мкг белка) в 10–13 %-ном ПААГ в присутствии Ds-Na осуществляли полусухой перенос полипептидов из геля на нитроцеллюлозную мембрану. Мембрану инкубировали в течение 2 ч при 20 °С в буфере TNT (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.1 % Tween-20), затем в течение 1 ч в буфере TNT, содержащем 2–5 %-ное обезжиренное молоко и mAb мыши к β-актину (1 : 200), или субъединице Rpt6 (1 : 2500), или субъединицам α1,2,3,5,6,7 (1 : 2500) (или pAb кролика к nNOS (1 : 500), или к субъединице X(β5), или LMP7(β5i), или LMP2(β1i) в разведении 1 : 1250). Затем мембрану отмывали несколько раз буфером TNT и инкубировали в течение 1 ч в буфере TNT, содержащем 2–5 %-ное обезжиренное молоко и антитела к IgG мыши (или кролика), конъюгированные с пероксидазой, в разведении 1 : 2500. После отмывки в буфере TNT мембрану подвергали стандартной обработке системой ECL.

Для анализа изображения использовали компьютерную программу ImageJ. Относительное содержание исследуемых белков в осветленных гомогенатах определяли по плотности соответствующих полос на рентгеновской пленке. Предварительно строили графики зависимости плотности от количества белка, подвергаемого Вестерн-блоттингу. Для дальнейшей работы выбирали тот диапазон количества белка, в котором указанная зависимость носила прямолинейный характер.

Статистический анализ. Данные представлены как среднее ± доверительный интервал (δ):

$$\delta = \pm t\sigma n^{-0.5},$$

где *t* – коэффициент Стьюдента при уровне значимости *p* < 0.05, *σ* – стандартная ошибка, *n* – число экспериментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Гистологическое исследование печени мышей. На рис. 1 представлены результаты гистологического исследования печени через 12 мес. после инъекции мышам дипина и последующей операции частичной гепатэктомии. В ткани печени выявляются множественные узелки (доброкачественные новообразования, микроаденомы) (рис. 1, а), которые формируются в диффузном процессе регенераторной узелковой гиперплазии гепатоцитов. Кроме того, были об-

наружены крупные доброкачественные новообразования, аденомы (рис. 1, б) и злокачественные новообразования, соответствующие по биологическим характеристикам гепатоклеточным карциномам трабекулярного типа (рис. 1, в) [21]. В образцах опухолей и фрагментах печени с диффузной узелковой гиперплазией исследовали ХТП-активность тотального пула протеасом и содержание различных субъединиц протеасом в сравнении с таковыми в печени контрольных животных.

Технические замечания по исследованию изменений в пуле протеасом при образовании опухолей. Относительное содержание тотального пула протеасом в образцах исследовали Вестерн-блоттингом с применением антител к субъединицам α1,2,3,5,6,7, входящим в состав всех форм протеасом. Аналогично определяли относительное содержание 26S-протеасом с использованием антител к субъединице Rpt6, входящей в состав 19S-субчастицы 26S-протеасом, и относительное содержание протеолитических субъединиц X(β5), LMP7(β5i) и LMP2(β1i) протеасом с использованием антител к этим субъединицам.

Наряду с исследованием содержания субъединиц протеасом в осветленных гомогенатах печени и индуцированных опухолей было проанализировано содержание тотального белка и β-актина, обычно используемых для стандартизации активности и количества изучаемых белков в различных тканях. Содержание тотального белка в осветленном гомогенате гепатоклеточной карциномы было незначительно, но достоверно снижено по сравнению с таковым в осветленном гомогенате интактной печени (табл. 1). В то же время содержание β-актина было существенно выше в образце гепатоклеточной карциномы (рис. 2, табл. 1). Поэтому в настоящем исследовании оба эти показателя непригодны к использованию в качестве внутреннего контроля для стандартизации характеристик исследуемых белков. Более корректным представляется сравнение активности и содержания субъединиц протеасом в печени контрольных мышей и печеночных опухолях из расчета на стандартизированный вес сырой ткани.

Следует отметить, что в качестве дополнительного контроля использовали печень, регенерировавшую после операции частичной резекции и не подвергнутую действию дипина. Осветленные гомогенаты ткани этой печени не от-

личались от осветленных гомогенатов интактной печени по ХТП-активности протеасом и уровню всех исследованных субъединиц протеасом, β-актина и тотального белка (данные не приведены).

Сходство и отличие в изменении пула протеасом при образовании доброкачественных и злокачественной опухолей. Изменения в пуле протеасом начинаются уже при образовании диффузных узелков и выражаются в увеличении тотального пула протеасом и возрастании экспрессии конститутивной субъединицы X(β5) и иммунных субъединиц LMP7(β5i) и LMP2(β1i) (рис. 2, табл. 1). По степени увеличения экспрессии эти субъединицы встраиваются в ряд: LMP2(β1i) > LMP7(β5i) > X(β5). Причем по возрастанию содержания субъединицы LMP2(β1i) можно судить и о возрастании содержания третьей иммунной субъединицы LMP10(β2i), поскольку они встраиваются в протеасомы совместно, в то время как иммунная субъединица LMP7(β5i) способна включаться в протеасомы независимо от двух других иммунных субъединиц [22, 23]. Повышение уровня исследованных субъединиц в общем пуле протеасом сопровождалось снижением его активности по отношению к олигопептиду Suc-LLVY-АМС, утилизирующемуся ХТП-центрами конститутивной субъединицы X(β5) и иммунной субъединицы LMP7(β5i) (табл. 1).

Образование злокачественной опухоли было связано с еще более сильным падением ХТП-активности протеасом и еще более выраженным увеличением тотального пула протеасом и содержания иммунных субъединиц и конститутивной субъединицы X(β5) (рис. 2, табл. 1). Однако характер возрастания уровня этих субъединиц был иным: LMP2(β1i) > X(β5) > LMP7(β5i). Следует отметить, что, хотя содержание иммунной субъединицы LMP7(β5i) в гепатоклеточной карциноме превышало таковое в контрольной ткани печени и фрагментах печени с диффузными узелками, однако оно не отличалось от содержания этой субъединицы в аденоме. В свою очередь, аденома занимала промежуточное положение между образцами пе-

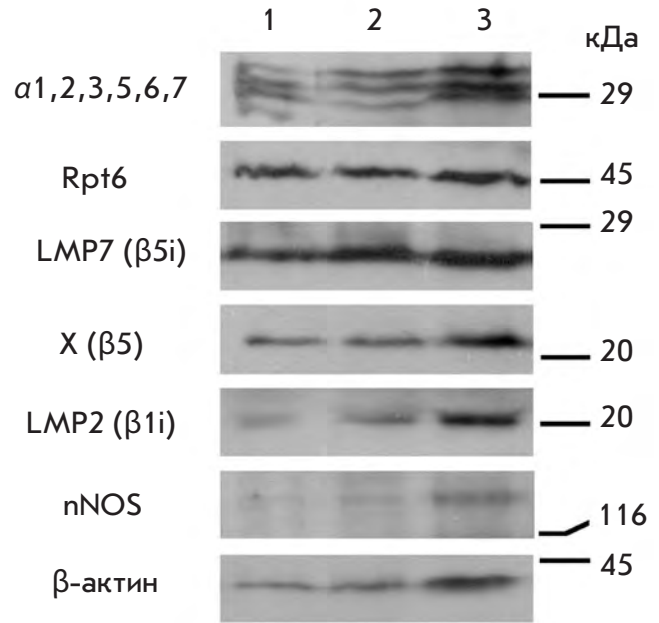


Рис. 2. Вестерн-блоты белков осветленных гомогенатов интактной печени (1), печени с диффузными узелками (2) и гепатоклеточной карциномы (3) с использованием антител к субъединицам α1,2,3,5,6,7, Rpt6, LMP7(β5i), X(β5), LMP2(β1i) протеасом, nNOS и β-актину. Маркеры: карбоангидраза (29 кДа), овальбумин (45 кДа), ингибитор трипсина (20 кДа) и β-галактозидаза (116 кДа)

чени с диффузными узелками и гепатоклеточной карциномой по содержанию тотального пула протеасом, иммунной субъединицы LMP2(β1i) и ХТП-активности (рис. 2, табл. 1). Эти результаты позволяют говорить о том, что при образовании доброкачественных и злокачественной опухолей тотальный пул протеасом увеличивается за счет множественных форм иммунных протеасом, нарабатывающихся

Таблица 1. ХТП-активность протеасом и содержание субъединиц протеасом, nNOS, β-актина и тотального белка в осветленных гомогенатах печени и индуцированных печеночных опухолей у мышей

Параметр	Значение параметра в осветленном гомогенате				
	интактной печени	печени с узелковой гиперплазией гепатоцитов	аденомы	гепатоклеточной карциномы	
ХТП-активность протеасом в 100 мкл образца (нмоль Suc-LLVY-АМС)	18.6 ± 1.3	13.7 ± 0.5	11.2 ± 0.5	5.3 ± 0.3	
Содержание субъединиц протеасом (%)	α1,2,3,5,6,7	100 ± 4	135 ± 3	147 ± 2	220 ± 6
	Rpt6	100 ± 3	98 ± 3	101 ± 5	150 ± 6
	X(β5)	100 ± 3	125 ± 5	–	210 ± 8
	LMP7(β5i)	100 ± 5	150 ± 4	170 ± 5	169 ± 7
	LMP2(β1i)	100 ± 3	200 ± 7	290 ± 17	400 ± 15
Содержание nNOS (%)	слабо выявл.	100 ± 3	–	450 ± 13	
Содержание β-актина (%)	100 ± 2	102 ± 3	97 ± 8	270 ± 7	
Концентрация белка (мг/мл)	29.5 ± 0.9	26.5 ± 1.1	26.0 ± 0.7	24.0 ± 0.8	

За 100 % принято содержание (оптическая плотность полос) субъединиц протеасом и β-актина в осветленном гомогенате интактной печени, nNOS – в осветленном гомогенате печени с узелковой гиперплазией гепатоцитов. Результаты представлены как среднее ± δ. Для каждой точки p < 0.05, n ≥ 5.

в разных соотношениях. К их числу относятся протеасомы, содержащие все три иммунные субъединицы LMP7($\beta 5i$), LMP2($\beta 1i$) и LMP10($\beta 2i$), протеасомы, содержащие иммунную субъединицу LMP7($\beta 5i$) и конститутивные субъединицы Y($\beta 1$) и Z($\beta 2$), а также протеасомы, содержащие конститутивную субъединицу X($\beta 5$) и иммунные субъединицы LMP2($\beta 1i$) и LMP10($\beta 2i$).

Падение ХТП-активности при образовании опухолей нельзя объяснить исключительно изменением соотношения субъединиц X($\beta 5$) и LMP7($\beta 5i$), проявляющих эту активность, поскольку не наблюдается корреляции между данными величинами (табл. 1). Вероятно, более существенное влияние на ХТП-активность оказывает встраивание в протеасомы субъединицы LMP2($\beta 1i$) и/или действие внутриклеточных регуляторов.

В настоящей работе выявлено принципиальное отличие пула протеасом злокачественной опухоли от пулов протеасом доброкачественных опухолей. Из всех исследованных опухолей только гепатоклеточная карцинома содержала повышенное количество 19S-активатора, входящего в состав и определяющего уровень 26S-протеасом (рис. 2, табл. 1). Возрастание уровня 26S-протеасом в гепатоклеточной карциноме вполне объяснимо. Злокачественные опухоли, в т.ч. опухоли печени, характеризуются усиленным обменом белка [24, 25], который требует, в свою очередь, увеличенного содержания протеолитических ферментов, в частности 26S-протеасом.

Вместе с тем причина возрастания уровня иммунных протеасом в гепатоклеточной карциноме не столь очевидна. С одной стороны, правомочно полагать, что иммунные протеасомы нарабатываются в трансформирующихся клетках для выявления и уничтожения этих клеток иммунной системой. Вполне возможно, что в исследуемой нами модели нефункциональны какие-то иные звенья, необходимые для развития иммунной реакции. Поэтому сколько бы ни нарабатывалось иммунных протеасом в опухолевых клетках, иммунная система не способна их уничтожить. Изучение этого вопроса входит в наши дальнейшие задачи. С другой стороны, учитывая антиоксидативную функцию иммунных протеасом, можно полагать, что путем их дополнительной наработки опухолевые клетки защищаются от действия метаболитов и иных факторов, приводящих к развитию окислительного стресса и апоптозу.

Возможный механизм регуляции содержания иммунных протеасом в опухолях. Отметим, что NO-зависимый сигнальный путь, направленный на «гашение» окислительного стресса в эндотелиальных клетках, связан с дополнительной экспрессией иммунной субъединицы LMP2($\beta 1i$) в большей степени, чем иммунной субъединицы LMP7($\beta 5i$) [7]. Эти данные совпадают с полученными нами результатами по динамике экспрессии иммунных субъединиц при образовании опухолей печени (табл. 1). Антиоксидативная функция иммунных протеасом в эндотелиальных клетках заключается в устранении рецептора трансферрина и бло-

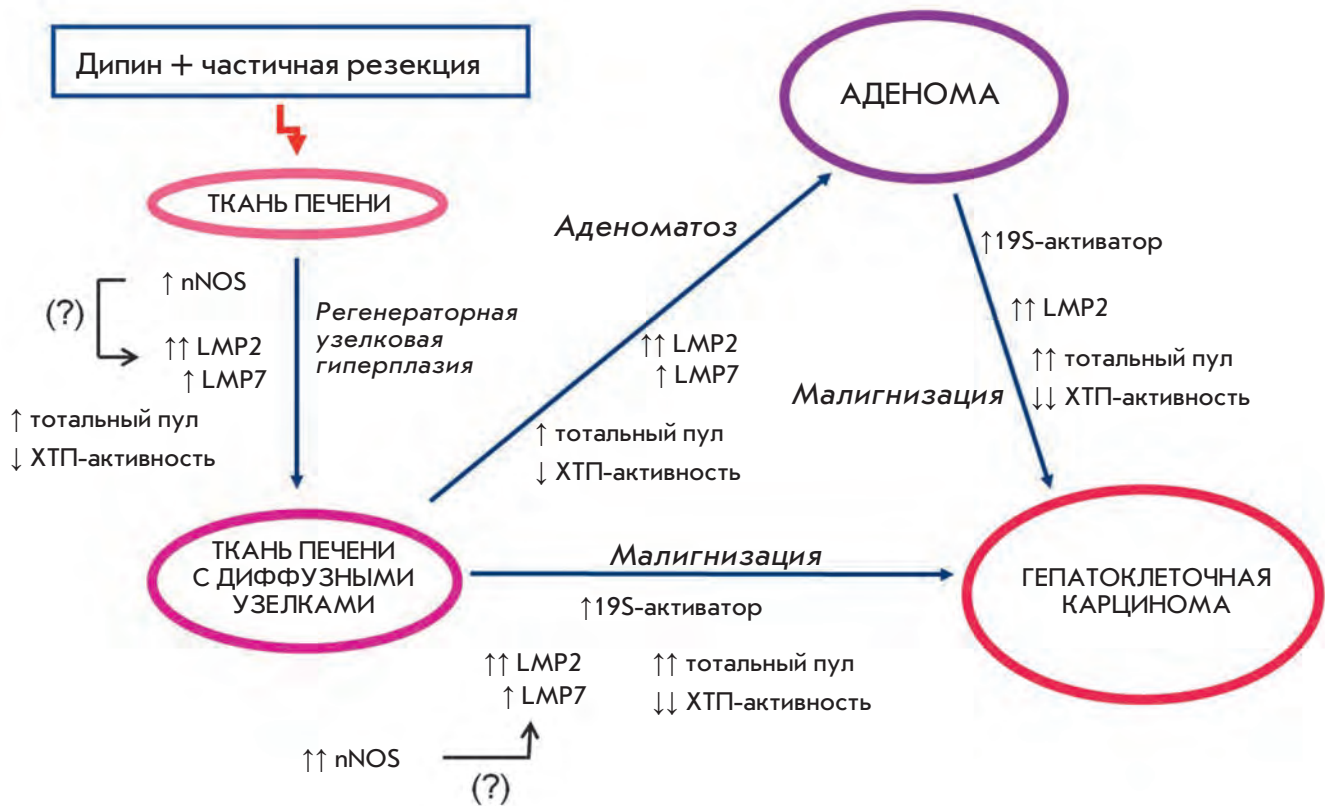


Рис. 3. Схема злокачественной трансформации клеток печени, основанная на изменениях в пуле протеасом

кировании развития цепных реакций свободнорадикального окисления с участием двухвалентного железа [7]. Вместе с тем убедительно показано, что NO играет роль антиоксиданта и в злокачественных клетках [26–28]. Не исключено, что в гепатоклеточной карциноме иммунные протеасомы также включены в NO-зависимый сигнальный путь, защищающий опухоль от окислительного стресса. В пользу этого предположения свидетельствуют полученные нами данные по увеличению экспрессии nNOS в гепатоклеточной карциноме (рис. 2, табл. 1). В то же время nNOS слабо выявлялась в печени контрольных мышей. Этот результат совпадает с литературными данными, указывающими на то, что содержание nNOS в печени взрослых мышей резко падает по сравнению с содержанием этого фермента в фетальной печени, где он регулирует гематопоз [29].

Итак, в настоящей работе показано, что образование опухоли печени у мышей связано с существенными изменениями в пуле протеасом. Причем эти изменения при узелковой гиперплазии гепатоцитов и аденоматозе выражены в меньшей степени по сравнению с изменениями при формировании гепатоклеточной карциномы, что позволяет предположить, что узелковая гиперплазия и аденоматоз являются этапами, предшествующими образованию злокачественной опухоли. На рис. 3 представлена схема злокачественной трансформации клеток печени, основанная на анализе полученных результатов.

Проведенная работа ставит новые задачи поиска сигнальных путей, приводящих к изменению экспрессии различных субъединиц протеасом при образовании опухолей. Кроме того, полученные результаты указывают на перспективность использования 19S-активатора протеасом, избыточно экспрессирующегося в злокачественных новообразованиях, в качестве мишени для разработки новых противоопухолевых лекарств. Следует отметить, что в настоящее время используется первое противоопухолевое лекарство, bortezomib (Velcade), действующее на протеасомы [30]. Bortezomib вводится в кровотоки пациентов и применяется в комплексе с другими противоопухолевыми средствами. Являясь производным бороната, bortezomib конкурентно ингибирует ХТП-активность всех форм протеасом

и временно индуцирует апоптоз, преимущественно неопластических клеток. Длительное ингибирование активности протеасом приводит к «включению» механизмов обратной связи и образованию новых протеасом [31], что объясняет временный терапевтический эффект лекарства. Вместе с тем, действуя на тотальный пул протеасом всех органов, bortezomib вызывает побочные эффекты: утомляемость, слабость, желудочно-кишечные нарушения, периферическую нейропатию и существенное ухудшение общего состояния пациентов [30]. В этой связи подавление функций 19S-активатора при сохранении протеолитической активности протеасом представляется более эффективным и безопасным способом противоопухолевой терапии.

ВЫВОДЫ

Регенераторная узелковая гиперплазия гепатоцитов, аденоматоз и образование гепатоклеточной карциномы сопровождаются изменениями в пуле протеасом, характеризующимися как сходством, так и отличием. Сходство заключается в увеличении содержания иммунных протеасом, тотального пула протеасом и падении ХТП-активности протеасом во всех опухолях по сравнению с контролем. Отличие касается 19S-активатора протеасом, уровень которого повышается только в гепатоклеточной карциноме.

Динамика изменений в пулах протеасом печени с регенераторной узелковой гиперплазией гепатоцитов, аденомы и гепатоклеточной карциномы указывает на то, что регенераторная узелковая гиперплазия гепатоцитов и аденоматоз могут быть стадиями, предшествующими злокачественной трансформации клеток печени.

19S-активатор протеасом, избыточно экспрессирующийся только в злокачественно трансформированных клетках печени, представляется перспективной мишенью для разработки новых противоопухолевых лекарств. ●

Авторы выражают благодарность В.С. Гореловой за помощь в работе.

Работа поддержана Федеральным агентством по науке и инновациям (ГК 02.512.12.2047) и РФФИ (грант № 09-04-00077).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rock K.L., Goldberg A.L. // Annu. Rev. Immunol. 1999. V. 17. P. 739–779.
2. Шарова Н.П. // Онтогенез. 2006. Т. 37. С. 171–178.
3. Sharova N., Zakharova L. // Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery. 2008. V. 2. P. 152–161.
4. Tanaka K. // Proc. Jpn. Acad., Ser. B. 2009. V. 85. P. 12–36.
5. Caudill C.M., Jayarapu K., Elenich L., et al. // J. Immunol. 2006. V. 176. P. 4075–4082.
6. Singh S., Awasthi N., Ekwuagu C., Wagner B.J. // Arch. Biochem. Biophys. 2002. V. 405. P. 147–153.
7. Kotamraju S., Matalon S., Matsunaga T., et al. // Free Rad. Biol. Med. 2006. V. 40. P. 1034–1044.
8. Grune T., Reinheckel T., Davies K.J.A. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 15504–15509.
9. Voigt A., Salzmann U., Seifert U., et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2007. V. 355. P. 549–554.
10. Yuksek K., Chen W.L., Chien D., Ou J.H. // J. Virol. 2009. V. 83. P. 612–621.
11. Meidenbauer N., Zippelius A., Pittet M.J., et al. // Cancer Res. 2004. V. 64. P. 6319–6326.
12. Gobbi G., Mirandola P., Micheloni C., et al. // Int. J. Oncol. 2004. V. 25. P. 1625–1629.
13. Chen L., Madura K. // Cancer Res. 2005. V. 65. P. 5599–5606.
14. Barnes C.J., Li F., Talukder A.H., Kumar R. // Clin. Cancer Res. 2005. V. 11. P. 2868–2874.
15. Mehling M., Simon P., Mittelbronn M., et al. // Acta Neuropathol. 2007. V. 114. P. 111–119.
16. Deng S., Zhou H., Xiong R., et al. // Breast Cancer Res. Treat. 2007. V. 104. P. 21–30.
17. Uryvaeva I.V. // Monogr. Dev. Biol. 1992. V. 23. P. 230–236.
18. Урываева И.В. // Биол. эксперим. биологии и медицины. 1997. Т. 124. С. 364–368.
19. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265–275.
20. Ben-Shahar S., Komlosch A., Nadav E., et al. // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. P. 21963–21972.
21. Becker F.F. // Cancer Res. 1982. V. 42. P. 3918–3923.
22. Groettrup M., Stander S., Stohwasser R., Kloetzel P.-M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. P. 8970–8975.
23. Griffin T.A., Nandi D., Cruz M., et al. // J. Exp. Med. 1998. V. 187. P. 97–104.
24. Бульдьева Т.В., Базарнова (Астахова) Т.М., Кузьмина С.Н., Збарский И.Б. // Эксперим. онкология. 1984. Т. 6. С. 35–38.
25. Bazaranova (Astakhova) T.M., Buldyeva T.V., Filatova L.S., Akopov S.B., and Zbarsky I.B. // Cell Res. 1998. V. 8. P. 195–207.
26. Juckett M.B., Weber M., Balla J. // Free Rad. Biol. Med. 1996. V. 20. P. 63–73.
27. Gorbunov N.V., Yalovich J.C., Gaddam A., et al. // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. P. 12328–12341.
28. Кондакова И.В., Загребельная Г.В. // Биомедицинская химия. 2004. Т. 50. С. 571–581.
29. Krasnov P., Michurina T., Packer M.A., et al. // Mol. Med. 2008. V. 14. P. 141–149.
30. Field-Smith A., Morgan G.J., Davies F.E. // Ther. Clin. Risk Manag. 2006. V. 2. P. 21–279.
31. Naujokat C., Fuchs D., Berges C. // Biochim. Biophys. Acta. 2007. V. 1773. P. 1389–1397.