

УДК 618.14-006.6:577.23

РЕГУЛЯЦИЯ ИНСУЛИНОПОДОБНЫХ ФАКТОРОВ РОСТА И NF-κB ПРОТЕАСОМНОЙ СИСТЕМОЙ ПРИ РАКЕ ЭНДОМЕТРИЯ

© 2012 г. Л. В. Спирина, Н. В. Бочкарева*, И. В. Кондакова, Л. А. Коломиец, Е. Е. Шашова, В. Д. Коваль, А. Л. Чернышова, О. Н. Асадчикова

Научно-исследовательский институт онкологии Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, Томск, 634009

Поступила в редакцию 22.06.2011 г.

Принята к печати 30.08.2011 г.

Инсулиноподобные факторы роста (ИФР) и ядерный фактор κB (NF-κB) играют важную роль в патогенезе рака эндометрия, однако их протеолитическая регуляция не изучена. В представленной работе анализировали связь между химотрипсиноподобной активностью протеасом и содержанием ИФР-I, ИФР-II и NF-κB в тканях рака эндометрия. Показано, что суммарная активность протеасом и пулов 20S и 26S протеасом в злокачественных опухолях значительно выше, чем в неизменном эндометрии. Обнаружены отрицательные корреляционные связи между активностью пула 26S протеасом и содержанием p50 NF-κB, а также между активностью пулов 26S и 20S протеасом и содержанием ИФР-I. Полученные данные свидетельствуют о возможной регуляции содержания ростового и транскрипционного факторов протеасомами. Считается, что ИФР-I находится преимущественно во внеклеточном пространстве, поэтому в регуляции содержания ИФР-I, вероятно, принимают участие и внеклеточные протеасомы. Существование положительной корреляции между уровнями ИФР-I и металлопротеиназы PAPP-A дает основание считать, что этот протеолитический фермент можно рассматривать как важный регулятор содержания фактора роста, который расщепляет белки, связывающие ИФР-I, и тем самым повышает его уровень в тканях. Показана возможность протеолитической регуляции ростовых и ядерных факторов, что может играть важную роль в патогенезе злокачественных новообразований.

Ключевые слова: инсулиноподобные факторы роста, NF-κB, протеасома, рак эндометрия.

REGULATION OF INSULINE-LIKE GROWTH FACTORS AND NF-κB BY PROTEASOME SYSTEM IN ENDOMETRIAL CANCER, by L. V. Spirina, N. V. Bochkareva*, I. V. Kondakova, L. A. Kolomiets, E. E. Schaschova, V. D. Koval, A. L. Chernyshova, O. N. Asadchikova (Cancer Research Institute, Siberian Division, Russian Academy of Medical Science, Tomsk, Russian Federation; *e-mail: bochkarevanv@oncology.tomsk.ru). Insulin-like growth factors and the nuclear factor κB (NF-κB) are known to play an important role in pathogenesis of endometrial cancer. However, there is still uncertainty about their proteolytic regulation. We studied the correlation between chymotrypsin-like activity of proteasomes and IGF-I, IGF-II and NF-κB levels in endometrial cancer tissues. The total activity of proteasomes and the 20S and 26S proteasome activities were shown to be significantly higher in malignant tumors than in unaltered endometrium. Negative correlations between the 26S proteasome activity and NF-κBp50 level as well as between the 26S and 20S proteasome activities and IGF-I level were found. The data obtained indicate a possible proteasome regulation of growth and transcription factors. As it is considered that the major pool of IGF-I is located in the extracellular space, it is likely that extracellular proteasomes also take part in the regulation of IGF-I content. The positive correlation between IGF-I level and PAPP-A metalloproteinase gives evidence that this proteolytic enzyme is another important regulator of growth factor level, which provides proteolysis of IGF-I binding proteins and increasing IGF-I concentration in tissues. The present data show possibility of proteolytic regulation of growth and nuclear factors that can play an important role in cancer pathogenesis.

Keywords: insuline-like growth factors, NF-κB, proteasome, endometrial cancer.

Принятые сокращения: ИФР-I, ИФР-II – инсулиноподобные факторы роста I и II соответственно; IGFBP – белок, связывающий ИФР; PAPP-A (pregnancy-associated plasma protein-A) – протеиназа, расщепляющая IGFBP-2, -4 и -5; NF-κB – ядерный фактор транскрипции; I-κB – ингибитор NF-κB; IRS – внутриклеточные субстраты рецептора инсулина.

* Эл. почта: bochkarevanv@oncology.tomsk.ru

Особенности роста, развития и метастазирования злокачественных опухолей определяются ростовыми и транскрипционными факторами, наиболее значимые среди которых – инсулиноподобные факторы роста (ИФР) и ядерный фактор κB (NF- κB). В настоящее время сформировано понятие об ИФР-системе, в которую входят ИФР-I и ИФР-II, рецептор ИФР первого типа, а также шесть белков, связывающих ИФР (IGFBP). Кроме того, функционально с этой системой связаны протеиназы, расщепляющие IGFBP, среди которых важную роль отводят белку, ассоциированному с беременностью – PAPP-A (pregnancy-associated plasma protein) [1]. Значение ИФР, их рецепторов и IGFBP в патогенезе рака представляется многоплановым. Свой вклад в регуляцию биодоступности ИФР вносят и IGFBP, содержание которых, в свою очередь, регулируется эстрогенами, прогестероном, специфическими протеазами и самими ИФР [2].

Факторы роста, в том числе и ИФР, индуцируют транскрипционную активность NF- κB , который представлен пятью регуляторными белками (p50, p65, p52, c-Rel, Rel-B). Эти белки формируют гомо- и гетеродимеры различного строения. К функционально активным и наиболее изученным относятся гетеродимер p65/p50 и гомодимер p65/p65, в то время как гомодимер p50/p50, как предполагают, это неактивная форма NF- κB [3–5]. С NF- κB тесно связано семейство их ингибиторов (I- $\kappa\text{B}\alpha$, I- $\kappa\text{B}\beta$, I- $\kappa\text{B}\epsilon$, Bcl-3). NF- κB не только вовлечен в стресс-индуцированные, иммунные и воспалительные реакции, он ассоциирован также с апоптозом и контролем пролиферации клеток, что делает понятным роль этого фактора в канцерогенезе [6]. Известно, что субъединица p50 фактора NF- κB образуется из предшественника p105, посттрансляционная модификация которого осуществляется с помощью протеасом. В отсутствие стимулирующих сигналов NF- κB находится в цитоплазме в ассоциации с I- κB . Ключевой этап активации NF- κB – его освобождение из комплекса с I- κB , который подвергается протеасомной деградации. Активированный NF- κB транслоцируется в ядро, связывается с ДНК и индуцирует транскрипцию. Активировать NF- κB могут липополисахарады, воспалительные цитокины, свободные радикалы, ультрафиолетовое излучение, а также факторы роста. Например, фактор роста гепатоцитов индуцирует как связывание NF- κB с ДНК, так и его транскрипционную активность через сигнальные пути ERK1/2 и p38 [7]. Другой путь, вовлеченный в повышение уровня NF- κB -зависимой транскрипции – это путь PIK3/Akt. Этот путь активируется посредством как рецептора фактора роста эпидермиса, так и рецептора ИФР первого типа [2]. В ряде работ получены до-

казательства, свидетельствующие о существовании регуляторной связи между активностью NF- κB и клеточной продукцией факторов роста по типу обратной связи. Так, в условиях гипоксии продукция плацентарного фактора роста в клеточных линиях контролируется NF- κB [8]. Показано, что активация мезенхимальных стволовых клеток в результате обработки эндотоксином, фактором некроза опухолей или инкубации в течение 24 ч в условиях гипоксии сопровождается значительным приростом ИФР-I, фактора роста эндотелия сосудов и других факторов роста в клеточной культуре, причем продукция этих факторов возрастает по NF- κB -зависимому механизму [9].

Необходимо отметить, что регуляторным этапом многих физиологических и патологических процессов является внутриклеточная деградация белков в протеасомах. Убиквитин-протеасомная система принимает участие в разрушении многих регуляторных белков, в том числе, вовлеченных в пути передачи сигналов от факторов роста и, частично, самих рецепторов этих факторов [10].

Основной компонент убиквитин-протеасомной системы – протеасомы – мультисубъединичные комплексы, включающие каталитическое ядро 20S, к которому присоединена одна или две регуляторные частицы. Если по крайней мере одна из этих частиц – PA700 (регуляторная частица 19S), то образуется 26S протеасома, осуществляющая, главным образом, АТФ- и убиквитин-зависимый протеолиз большинства клеточных белков. Если же в роли регуляторной частицы выступает другой белковый комплекс (PA28, PA200), то образуется активированная 20S протеасома, которая деградирует малые, аномальные и короткоживущие белки [11]. 20S протеасомы представлены иммунными и конститутивными формами, образующимися при сочетании конститутивных ($\alpha 1\alpha 2\alpha 3\alpha 4\alpha 5\alpha 6\alpha 7$) или иммунных (LMP 2, LMP 7, MECL-1) протеолитических субъединиц. Замена конститутивных субъединиц на иммунные приводит к образованию модифицированных форм протеасом и сопровождается изменением их специфичности, вследствие чего они продуцируют иммуногенные пептиды для презентации главным комплексом гистосовместимости. В то же время известно, что иммунные протеасомы могут выполнять неиммунные функции. Встроенные иммунные субъединицы изменяют активность протеасом [12]. Относительное содержание протеасом в клетке, их состав и активность варьируют в соответствии с потребностями клетки и условиями, в которых она находится, что становится возможным благодаря взаимодействию протеасом с большим количеством белков, а также еще малоизученным механизмам регуляции на уровне транскрипции [11].

Существует определенная взаимосвязь между компонентами ИФР-системы, NF-κB и активностью протеасом в клетках. Передача сигнала от активированного рецептора ИФР осуществляется через внутриклеточные субстраты рецептора инсулина (IRS). Показано, что уровень деградации IRS-2 в протеасомах влияет на степень активации ИФР-зависимого сигнального пути [13], а разрушение самого рецептора ИФР первого типа происходит в протеасомах [14]. В активации NF-κB участвуют протеасомы, которые деградируют I-κB. Таким образом, протеасомы, по-видимому, опосредовано связаны с механизмами развития опухоли, влияя на активность факторов транскрипции и синтез факторов роста, белков, связывающих эти факторы, и их протеаз. На клеточных линиях фибробластов человека показано, что ингибитор протеасом, который предотвращает активацию NF-κB, снижает продукцию фактора некроза опухолей α (TNFα) и стимулирует интерлейкином-1β содержание RAPP-A, а также протеазную активность RAPP-A в отношении IGFBR-4 [15]. Ингибитор протеасом бортезомид подавляет активность NF-κB, однако при детальном изучении выяснилось, что это ингибирование геноспецифично и зависит от субъединичного состава димеров NF-κB, рекрутированных к NF-κB-чувствительным промоторам [3]. Существует мнение, что если соотношение субъединиц p65/p50 NF-κB не превышает единицы, то это может свидетельствовать о синтезе функционально неактивных димеров NF-κB [16].

В настоящее время протеасомная регуляция содержания ИФР, NF-κB в злокачественных опухолях человека и взаимное влияние этих факторов изучены недостаточно. Проведение таких работ особенно актуально в случае рака эндометрия, так как система ИФР играет ведущую роль в развитии этой патологии [2, 17, 18]. Целью нашей работы стало проведение сравнительного анализа содержания компонентов системы ИФР, NF-κB, суммарной активности протеасом, а также их пулов и определение возможной регуляции экспрессии генов ростового и транскрипционного факторов системой внутриклеточного протеолиза.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Изученная выборка состояла из больных с морфологически верифицированным раком эндометрия I–II стадии ($n = 49$, средний возраст 56.8 ± 1.5 лет). Стадию Ia имели 13 больных, Ib – 24, Ic – 3; стадия II диагностирована у 9 человек. Объемы диагностики и противоопухолевой терапии соответствовали рекомендуемым алгоритмам объемов диагностики и лечения при злокачественных новообразованиях, утвержденных Ми-

нистерством здравоохранения и социального развития РФ. Проведение работы одобрено этическим комитетом НИИ онкологии СО РАМН. При оценке тканевого уровня ИФР и IGFBR была сформирована группа сравнения из 20 человек с гиперпластическими процессами в эндометрии. У пяти больных гистологически подтверждена атипичная гиперплазия эндометрия, у 15 – сложная типичная гиперплазия. Средний возраст больных этой группы составил 52.8 ± 4.5 лет. Образцы гиперплазированного эндометрия получали при выполнении гистероскопии с биопсией или радикальной операции.

При изучении протеасом использовали образцы опухолевой и гистологически неизменной ткани, удаленные на расстояние не менее 1 см от границы опухолей, полученные при выполнении радикального оперативного вмешательства. Образцы сразу после получения замораживали и хранили при -80°C .

Получение осветленных гомогенатов. Замороженную ткань (100 мг) гомогенизировали в жидком азоте, затем ресуспендировали в 300 мкл 50 мМ Трис-HCl-буфера (pH 7.5), содержащего 2 мМ АТФ, 5 мМ хлорид магния, 1 мМ дитиотреитол, 1 мМ EDTA и 100 мМ хлорид натрия. Гомогенат центрифугировали в течение 60 мин при 10000 g и 4°C .

Фракционирование протеасом. Все процедуры проводили при 4°C . Белки осветленных гомогенатов фракционировали с помощью сульфата аммония в два этапа. Фракцию, обогащенную 26S протеасомами, получали, добавляя сульфат аммония до 40% насыщения, фракцию 20S протеасом – до 70% насыщения [19]. Определяли активность протеасом во фракциях.

Определение активности протеасом. Химотрипсिनоподобную активность общего пула протеасом, пулов 26S и 20S протеасом определяли в осветленных гомогенатах опухолевых и неизменных тканей, а также во фракциях протеасом по гидролизу флуорогенного олигопептида N-сукцинил-Leu-Leu-Val-Tyr-7-амидо-4-метилкумарина, утилизирующегося химотрипсिनоподобными центрами протеасом [20]. Использовали флуориметр “Hitachi-850” (Япония) при длине волны возбуждения 380 нм и эмиссии 440 нм. Реакционная смесь для определения активности 20S протеасом содержала 20 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 1 мМ дитиотреитол и 30 мкМ N-сукцинил-Leu-Leu-Val-Tyr-7-амидо-4-метилкумарин. Для определения активности 26S протеасом в реакционную смесь дополнительно вводили 5 мМ хлорид магния и 1 мМ АТФ. Реакцию проводили при 37°C в течение 20 мин и останавливали 1%-ным додецилсульфатом натрия. Активность примесных протеаз в образцах оценивали с использованием специфического инги-

Таблица 1. Содержание (нг/мг белка) инсулиноподобных факторов роста, связывающих их белков и RAPP-A в гиперплазированном и малигнизированном эндометрии, Me (25–75%)

Эндометрий	ИФР-I	ИФР-II	IGFBP-3	IGFBP-4	RAPP-A
Гиперплазия	0.53 (0.29–1.25)	8.49 (4.92–17.74)	3.14 (1.02–11.1)	1.11 (0.39–1.46)	5.93 (2.00–10.9)
Рак	0.32 (0.16–0.55)*	5.05 (3.66–7.36)*	3.80 (1.90–6.98)	0.51 (0.22–1.83)*	6.42 (1.38–11.3)

* Статистическая значимость отличий от группы с гиперплазией эндометрия, $p < 0.05$.

битора протеасом – MG132. Удельную активность протеасом выражали в единицах активности на 1 мг белка. Содержание белка определяли по методу Лоури.

Определение содержания факторов роста, связывающих их белков, RAPP-A- и NF-κB. Суммарное содержание (внутриклеточных и внеклеточных) свободных факторов роста – ИФР-I, ИФР-II, а также IGFBP-3, IGFBP-4 и RAPP-A – определяли в образцах осветленных гомогенатов опухолей с использованием наборов для твердофазного иммуноферментного анализа (R&D Systems, DSL, США) на ИФА-анализаторе “Anthos 2020”. Уровень активированных форм p50 и p65 NF-κB определяли с помощью наборов для ELISA “Caymanchem” (США). Приготовление и очистку ядерных экстрактов тканевого гомогената проводили в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Содержание белка в гомогенатах и ядерных экстрактах определялся по методу Лоури. Содержание факторов роста, связывающих их белков и RAPP-A выражали в нг/мг белка, а NF-κB – в условных единицах на мг белка в лунке.

Статистическую обработку результатов проводили с применением пакета программ Statistica 6.0. В зависимости от вида распределения результаты представлены как $m \pm M$, где m – среднее выборочное, M – ошибка среднего, или как медиана с интерквартильным размахом (25-й и 75-й процентиля). Значимость различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента или критерия Манна–Уитни. Корреляционный анализ выполнен с использованием непараметрического критерия Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определение уровня ИФР, IGFBP и RAPP-A в опухолях эндометрия и в гиперплазированном эндометрии показало, что уровень обоих факторов роста и IGFBP-4 в опухолевой ткани был статистически значимо ниже, чем в гиперплазированной (табл. 1). Результаты определения NF-κB

p65 и p50, значения коэффициента p65/p50 в опухолевой ткани представлены в табл. 2 и свидетельствуют о значительном преобладании NF-κB p65. Так, коэффициент p65/p50 NF-κB в опухолях эндометрия составил 1.50, что свидетельствует о синтезе преимущественно активных форм NF-κB при этой патологии.

Установлено, что в ткани рака эндометрия суммарная активность протеасом в 2.7 раза выше, чем в неизменной ткани ($(164.1 \pm 25.6) \times 10^3$ и $(59.5 \pm 5.0) \times 10^3$ МЕ/мг белка соответственно), активность пула 26S протеасом повышалась в 1.9 раза, а пула 20S протеасом – в 2.6 раза (рис. 1).

При помощи корреляционного анализа в опухолях эндометрия выявлены взаимосвязи между активностью пулов 20S и 26S протеасом ($r = 0.59$; $p < 0.05$), а также между уровнем основных форм NF-κB – p50 и p65 ($r = 0.55$; $p < 0.05$). Связь между уровнем p50 NF-κB и активностью пула 26S протеасом и ИФР-I, а также между p65 и ИФР-I и RAPP-A в опухолях эндометрия представлена на рис. 2. Увеличение активности протеасом приводит к снижению уровня NF-κB. Обнаружена отрицательная корреляционная связь между активностью пула 26S протеасом и уровнем p50 NF-κB ($r = -0.40$; $p < 0.05$) (рис. 2a). Снижение содержания обеих форм NF-κB сопряжено с уменьшением уровня ИФР-I и RAPP-A: выявлены положительные корреляционные связи между уровнем p50 и p65 NF-κB, и ИФР-I ($r_1 = 0.51$; $r_2 = 0.40$; $p < 0.05$) и сильная корреляция между уровнем NF-κB p65 и

Таблица 2. Уровень субъединиц p65 и p50 NF-κB (Ед/мг белка в лунке) и соотношение p65/p50 в опухолях эндометрия, Me (25–75%)

NF-κB		
p65	p50	p65/p50
11.70 (7.80–18.15)	6.80 (3.30–16.20)	1.50 (0.95–2.90)

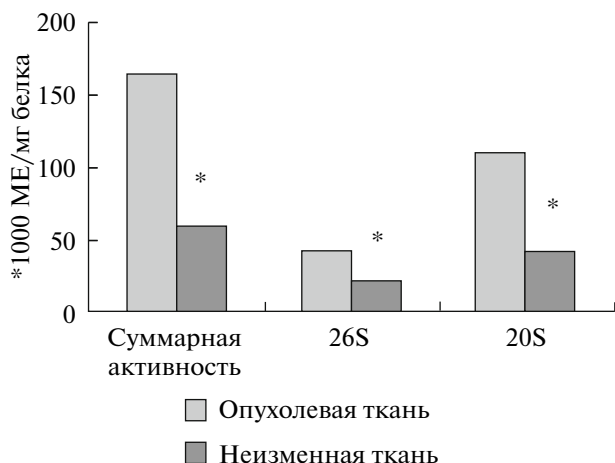


Рис. 1. Активность протеасом в ткани рака эндометрия и неизменной ткани. *Значимость различий по сравнению с неизменной тканью, $p < 0.05$.

RAR-А ($r = 0.72$; $p < 0.05$) (рис. 2б–г). Получены отрицательные корреляционные взаимосвязи между уровнем ИФР-I и активностью пулов 20S и 26S протеасом ($r_1 = -0.47$; $r_2 = -0.49$; $p < 0.05$) соответственно (рис. 3а, б).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Следует отметить, что нам не удалось найти публикации, в которых определены сравнительные параметры ИФР-системы при гиперплазии и раке эндометрия, за исключением уровня рецептора ИФР первого типа. Имеются лишь сведения о сходстве уровней ИФР-I и его рецептора в опухолях эндометрия и в соответствующей нетрансформированной ткани [2]. Снижение уровня обоих ИФР и IGFBR-4 в опухолях эндометрия может быть обусловлено либо снижением синтеза этих факторов, повышением их деградации или увеличением фракции ИФР, связанных с IGFBR. С учетом наших данных, согласно которым в опухолях эндометрия не повышен уровень IGFBR, но повышена суммарная активность протеасом и отдельных их пулов с параллельным снижением уровня NF-κB, можно предположить, что в опухолях эндометрия происходит NF-κB-зависимое снижение синтеза обоих ИФР.

Определенная нами активность протеасом в опухолевой и нормальной ткани соответствует результатам, полученным для опухолей другой локализации, таким как рак молочной железы, папиллярный рак почки, плоскоклеточный рак головы и шеи [21–23]. Вероятно, повышенная активность протеасом в опухоли по сравнению с неизменными тканями обусловлена тем, что все процессы, происходящие в клетке при опухолевом росте, очень интенсивны. Опухолевый рост

сопровождается нарушением клеточного цикла, усилением пролиферации, подавлением апоптоза. Несомненно, клетке, чтобы продолжать свое существование, необходимо усилить систему, обеспечивающую деградацию белкового и пептидного материала, выполнившего свою функцию. При этом синтез протеасомных субъединиц может усиливаться путем регуляции транскрипции генов, измениться на этапе сборки субъединиц или в результате изменения качества и количества белков, принимающих участие в контроле протеасомозависимого протеолиза [24]. Кроме того, в опухолях возможно усиление и/или нарушение механизма обратной связи между активностью протеасом и транскрипцией их генов. Так показано [25], что после воздействия ингибиторов протеасом в клетке усиливается биосинтез протеасом *de novo*, причем в опухолях этот феномен выражен сильнее, чем в нормальных тканях.

Прямую корреляционную зависимость между активностью пулов 26S и 20S протеасом при раке эндометрия можно объяснить как активацией транскрипции, так и действием внегеномных механизмов регуляции протеолиза. Предполагается, что факторы транскрипции Nrf1 и Nrf2 (nuclear factor erythroid-derived 2-related factor 2) в ответ на стрессовое воздействие осуществляют комплексную активацию транскрипции генов, кодирующих субъединицы протеасом. Поскольку происходит их совместная активация, то наблюдается одновременное повышение активности пулов как 20S, так и 26S протеасом. Влияние белков, участвующих в сборке протеасом и в контроле протеасомозависимого протеолиза, обусловлено воздействием многих факторов и распространяется на оба пула протеасом [24].

Схема возможной регуляции системы ИФР и NF-κB протеасомами при раке эндометрия представлена на рис. 4. Известно, что протеасомы принимают участие в активации NF-κB путем деградации I-κB. Одна из целей применения ингибиторов протеасом состоит в блокировании NF-κB-зависимой транскрипции: снижение активности протеасом приводит к уменьшению количества субъединиц NF-κB, свободных от ингибиторного белка и способных к транслокации в ядро. В то же время в нашей работе активность протеасом и содержание субъединицы p50 NF-κB связаны обратной зависимостью. Подобный факт описан на некоторых клеточных линиях, в том числе и на клетках рака эндометрия: ингибиторы протеасом вызывали активацию NF-κB [26]. Получены данные, указывающие на существование альтернативных, независимых от протеасом, путей активации NF-κB, прежде всего пути, опосредованного кальпаином [27]. Вероятно, при раке эндометрия NF-κB активируется преимущественно альтерна-

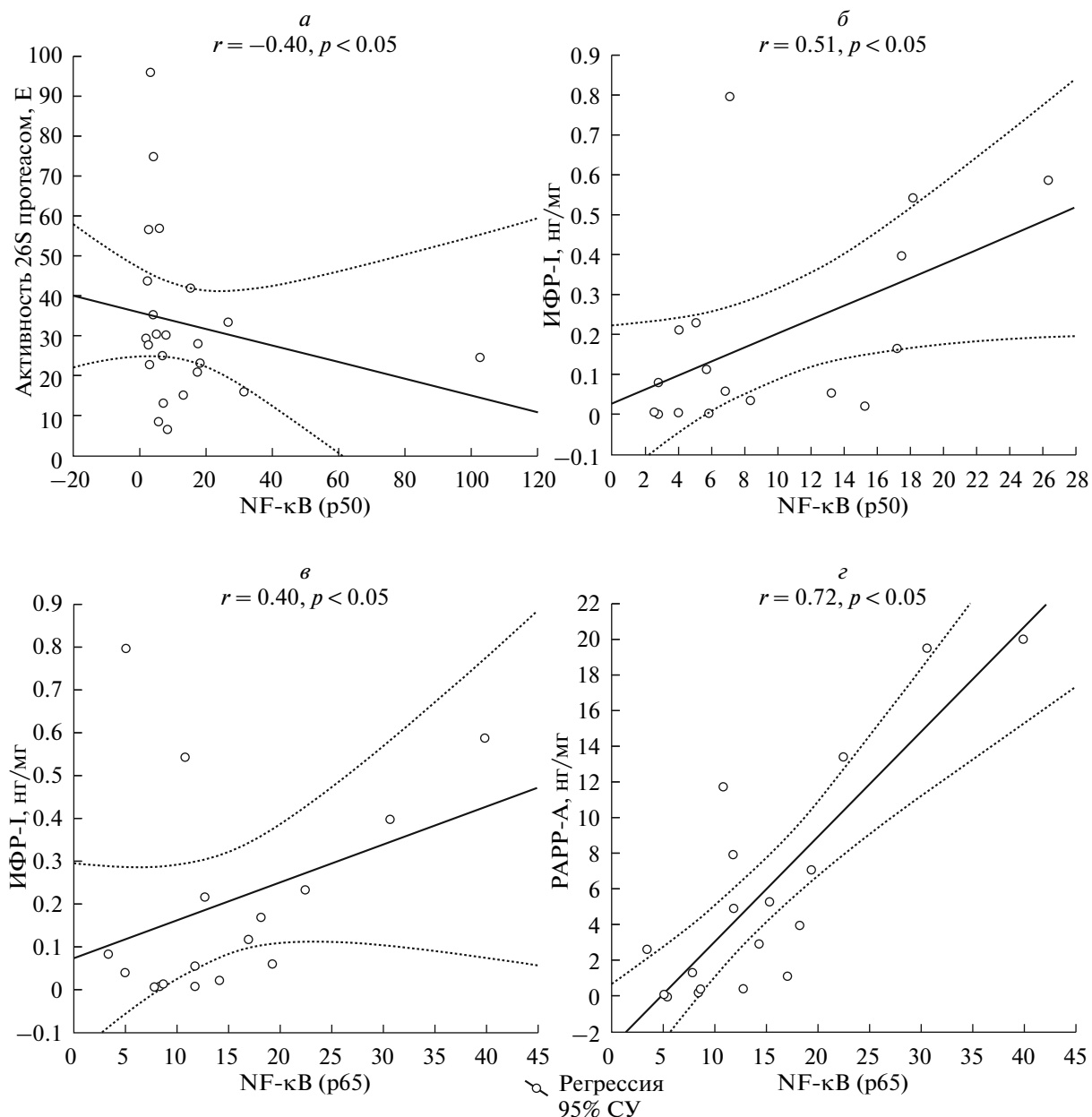


Рис. 2. График рассеяния при анализе корреляционных связей между активностью пула 26S протеасом и содержанием NF-κB p50 (а), уровнем ИФР-I и содержанием NF-κB p50 и p65 (б, в), уровнем RAPP-A и NF-κB p65 (г) в опухолях эндометрия.

тивным путем. Кроме того, известно, что и p50, и p65 могут впоследствии подвергаться протеасомной деградации. Таким образом, повышение активности протеасом при раке эндометрия может сопровождаться снижением уровня субъединицы p50 NF-κB.

Данные о высокой степени корреляции между синтезом субъединиц p50 и p65 NF-κB соответствуют результатам [28] о высоком сочетанном уровне “классических форм” NF-κB, p50 и p65 при раке эндометрия (иммуногистохимическое

исследование). Кроме того, высокая степень корреляции между p50 и p65 у млекопитающих обусловлена преимущественным синтезом гетеродимеров p65/p50 NF-κB [3, 5].

В нашей работе уровень активированных форм p50 и p65 связан непосредственно с уровнем ИФР-I в опухоли, что, по-видимому, обусловлено существованием обратной связи между указанными параметрами. Не исключено, что в опухолях эндометрия активация NF-κB различными стимулами, например гипоксией, ведет к повы-

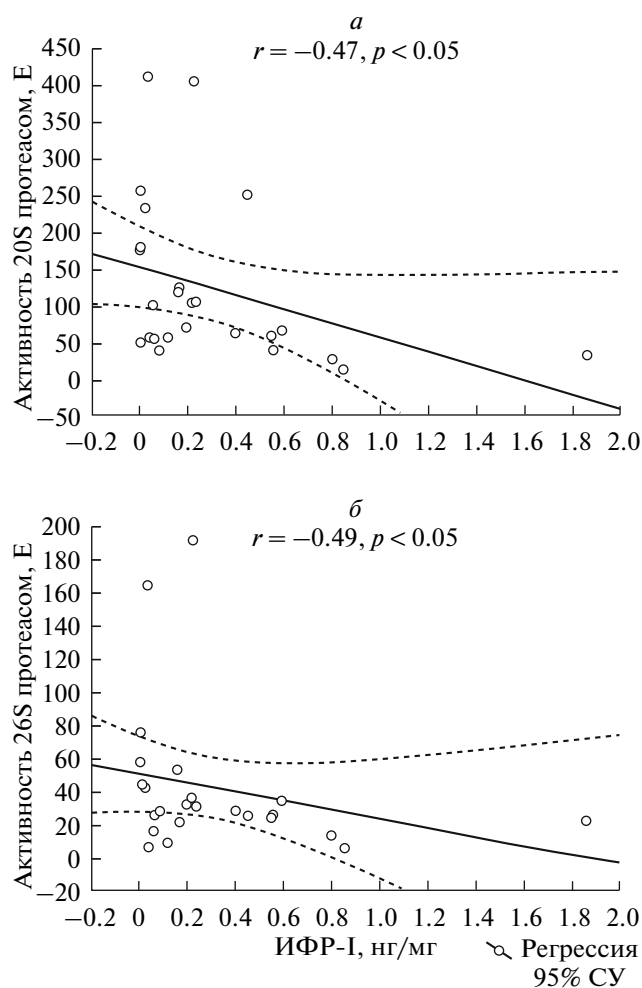


Рис. 3. График рассеяния при анализе корреляционных связей между активностью пулов 20S (а) и 26S (б) протеасом и содержанием ИФР-I опухолей эндометрия.

шению внутриклеточной продукции ИФР-I. Подобный вариант регуляции наблюдали, например, на клеточной линии мезенхимальных стволовых клеток [9]. Положительные корреляции между уровнем NF-κB p65 и RAPP-A соответствуют опубликованным данным о влиянии ядерных факторов транскрипции на синтез RAPP-A, регулируемый протеасомной системой [15]. Взаимосвязь между уровнем протеиназы RAPP-A в опухоли и уровнем ИФР-I обусловлена протеолитической активностью RAPP-A в отношении некоторых ИФР-связывающих белков, а именно IGFBP-2, -4 и -5. Таким образом, RAPP-A участвует в регуляции биодоступности ИФР-I [1].

Выявленные отрицательные корреляционные взаимосвязи между синтезом ИФР-I и активностью пулов 20S и 26S протеасом, по-видимому, не могут считаться прямыми, поскольку действие протеасом на факторы роста и связывающие их белки, как полагают, опосредовано факторами

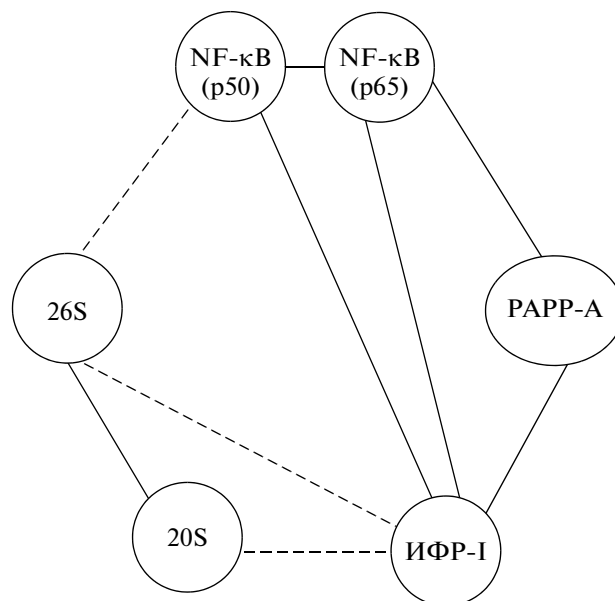


Рис. 4. Предполагаемая схема регуляции ИФР-системы и NF-κB протеасомами при раке эндометрия.

транскрипции, в том числе и NF-κB [9, 15]. Однако существуют данные о присутствии протеасом, представленных главным образом 20S протеасомами, во внеклеточных средах организма. Поскольку открытым остается вопрос о присутствии таких протеасом в различных тканях, их строении и функциях за пределами клетки, нельзя исключать участие внеклеточного пула протеасом в деградации внеклеточного пула ИФР-I [29, 30].

Таким образом, впервые проанализированы взаимосвязи между содержанием ИФР, NF-κB и химотрипсиноподобной активностью протеасом. Установлено, что протеасомы могут играть важную роль в регуляции содержания NF-κB и ИФР-I в тканях рака эндометрия. Следует отметить, что если фактор транскрипции прямо регулируется протеасомами, то влияние на ИФР-I, вероятно, опосредовано NF-κB. Нельзя исключить также расщепление ИФР-I во внеклеточных протеасомах. Другой важный регулятор содержания ИФР-I в клетках — металлопротеиназа RAPP-A. Однако не обнаружено статистически значимых связей между активностью протеасом и ИФР-I. Поскольку NF-κB и ИФР-I относятся к патогенетически значимым факторам рака эндометрия, изучение регуляции их содержания необходимо для понимания механизмов развития заболевания и поиска эффективных средств для молекулярно-направленной противоопухолевой терапии. Полученные данные свидетельствуют о возможности использования ингибиторов протеасом в таргетной терапии рака эндометрия. Необходимо

дальнейшее изучение протеасомной системы в контексте прогрессии и клинического течения рака эндометрия с целью выяснения возможной роли этой системы в метастазировании опухолей и ее использования для поиска новых маркеров прогноза течения заболевания.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы (ФЦП) “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009–2013 годы (Гос. контракт № П-320).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Firth S.M., Baxter R.C. 2002. Cellular action of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocrine Rev.* **23**(6), 824–854.
- Бочкарева Н.В., Коломиец Л.А., Кондакова И.В., Чернышова А.Л. 2009. Роль инсулиноподобных факторов роста и связывающих их белков в патогенезе и прогнозе рака эндометрия. *Рос. онкол. журн.* **3**, 46–50.
- Juvekar A., Manna S., Ramaswami S., Chang T.P., Vu H.Y., Ghosh C.C., Celiker M.Y., Vancurova I. 2011. Bortezomib induces nuclear translocation of I κ B α resulting in gene-specific suppression of NF- κ B-dependent transcription and induction of apoptosis in CTCL. *Mol. Cancer Res.* **9**(2), 183–194.
- Kostadinova R.M., Nawrocki A.R., Frey F.J., Frey B.M. 2005. Tumor necrosis factor alpha and phorbol 12-myristate-13-acetate down-regulate human 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 through p50/p50 NF-kappaB homodimers and Egr-1. *FASEB J.* **19**(6), 650–652.
- Marui N., Medford R.M., Ahmad M. 2005. Activation of RelA homodimers by tumor necrosis factor alpha: a possible transcriptional activator in human vascular endothelial cells. *Biochem. J.* **390**, 317–324.
- Baldwin A.S. 1996. The NF-kappa B and I-kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.* **14**, 649–683.
- Muller M., Morotti A., Ponzetto C. 2002. Activation of NF-B is essential for hepatocyte growth factor-mediated proliferation and tubulogenesis. *Mol. Cell. Biol.* **22**(4), 13012–13017.
- Cramer M., Nagy I., Murphy B.J., Gassmann M., Hottiger M.O., Georgiev O., Schaffner W. 2005. NF-kappaB contributes to transcription of placenta growth factor and interacts with metal responsive transcription factor-1 in hypoxic human cells. *Biol. Chem.* **386**(9), 865–872.
- Crisostomo P.R., Wang Y., Markel T., Wang M., Lahm T., Meldrum D.R. 2008. Human mesenchymal stem cells stimulated by TNF-alpha, LPS, or hypoxia produce growth factors by NF kappa B- but not JNK-dependent mechanism. *Am. Physiol. Cell. Physiol.* **294**(3), 675–682.
- Emmerich N.P., Nussbaum A.K., Stevanovic S., Priemer M., Toes R.E., Rammensee H.G., Schild H. 2000. The human 26S and 20S proteasomes generate overlapping but different sets of peptide fragments from a model protein substrate. *J. Biol. Chem.* **275**, 21140–21148.
- Сорокин А.В., Ким Е.Р., Овчинников Л.П. 2009. Протеасомная система деградации и процессинга белков. *Успехи биол. химии.* **49**, 3–76.
- Almond J.B., Cohen G.M. 2002. The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy. *Leukemia.* **16**(4), 433–443.
- Satoh S., Yanagita T., Maruta T., Nemoto T., Yoshikawa N., Kobayashi H., Tono T., Wada A. 2008. Proteasomal degradation of IRS-2, but not IRS-1 by calcineurin inhibition: attenuation of insulin-like growth factor-I-induced GSK-3beta and ERK pathways in adrenal chromaffin cells. *Neuropharmacology.* **55**(1), 71–79.
- Girnita L., Girnita A., Larsson O. 2003. Mdm2-dependent ubiquitination and degradation of the insulin-like growth factor 1 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**, 8247–8252.
- Resch Z.T., Oxvig C., Bale L.K., Conover C.A. 2006. Stress-activated signaling pathways mediate the stimulation of pregnancy-associated plasma protein-A expression in cultured human fibroblasts. *Endocrinol.* **147**(2), 885–890.
- Conner J.R., Smirnova I.I., Moseman A.P., Poltorak A. 2010. IRAK1BP1 inhibits inflammation by promoting nuclear translocation of NF-kappaB p50. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **107**(25), 11477–11482.
- Берштейн Л.М. 2004. *Онкоэндокринология: традиции, современность и перспективы.* М.: Наука.
- McC Campbell A.S., Broaddus R.R., Loose D.S., Davis P.J.A. 2006. Overexpression of the insulin-like growth factor I receptor and activation of the AKT pathway in hyperplastic endometrium. *Clin. Cancer Res.* **12**, 6373–6378.
- Абрамова Е.Б., Астахова Т.М., Ерохов П.А., Шарова Н.П. 2006. Множественность форм протеасом и некоторые подходы к их разделению. *Изв. РАН Сер. биол.* **2**, 150–156.
- Ben-Shahar S., Komlosch A., Nadav E., Shaked I., Ziv T., Admon A., DeMartino G.N., Reiss Y. 1999. 26S proteasome-mediated production of an authentic major histocompatibility class I-restricted epitope from an intact protein substrate. *J. Biol. Chem.* **274**(31), 21963–21972.
- Шашова Е.Е., Кондакова И.В., Слонимская Е.М., Глушенко С.А. 2010. *Всерос. научно-практическая конф. с международным участием “Актуальные вопросы онкологии”.* Красноярск. С. 226–227.
- Спирина Л.В., Кондакова И.В., Усынин Е.А., Коломиец Л.А., Винтизенко С.И., Бочкарева Н.В., Чернышова А.Л. 2009. Активность протеасом в тканях злокачественных опухолей различных локализаций. *Сиб. онкол. журн.* **5**, 43–48.
- Li C., Kiran M. 2005. Increased proteasome activity, ubiquitin-conjugating enzymes, and eEF1A translation factor detected in breast cancer tissue. *Cancer Res.* **65**, 5599–5606.
- Xie Y. 2010. Structure, assembly and homeostatic regulation of the 26S proteasome. *J. Mol. Cell Biol.* **2**, 308–317.

25. Xu H., Ju D., Jarois T., Xie Y. 2008. Diminished feedback regulation of proteasome expression and resistance to proteasome inhibitors in breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* **107**, 267–274.
26. Dolcet X., Llobet D., Encinas M., Pallares J., Cabero A., Schoenenberger J.A., Comella J.X., Matias-Guiu X. 2006. Proteasome inhibitors induce death but activate NF-kappaB on endometrial carcinoma cell lines and primary culture explants. *J. Biol. Chem.* **281(31)**, 22118–222130.
27. Perkins N.D., Gilmore T.D. 2006. Good cop, bad cop: the different faces of NF-kappaB. *Cell Death Differ.* **5**, 759–772.
28. Pallares J., Martinez-Guitarte J.L., Dolcet X., Llobet D., Rue M., Palacoos J., Prat J., Matias-Guiu X. 2004. Abnormalities in the NF-kappaB family and related proteins in endometrial carcinoma. *J. Pathol.* **204(5)**, 569–577.
29. Sixt S.U., Peters J. 2010. Extracellular alveolar proteasome. Possible role in lung injury and repair. *Am. Thoracic Soc.* **7**, 91–96.
30. Heubner M., Wimberger P., Dahlmann B., Kasimir-Bauer S., Kimmig R., Peters J., Wohlschlaeger J., Sixt S.U. 2011. The prognostic impact of circulating proteasome concentrations in patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* **120(2)**, 233–238.