

Л.В. Спирина^{1,2}, *Е.А. Усынин*¹, *И.В. Кондакова*¹, *З.А. Юрмазов*¹,
Е.М.Слонимская^{1,2}, *Е.С. Колегова*¹

Активация АКТ сигнального пути и уровень субстратов m-TOR в опухоли больных раком почки, связь с распространенностью злокачественного процесса

¹Томский научно-исследовательский институт онкологии

²ГОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Томск

Активация сигнального каскада АКТ и субстратов m-TOR ткани опухоли почки происходит за счет повышения уровня АКТ, ее фосфорилированной формы, серин/треониновой протеинкиназы m-TOR, регулятора обмена гликогена GSK-3-beta и ингибитора транскрипции 4E-BP1. Увеличение размера первичной опухоли сопровождается ростом в ней содержания c-Raf и снижением содержания phospho-m-TOR. Развитие диссеминированной формы заболевания сочеталось со снижением в опухоли PTEN и phospho-AKT.

Ключевые слова: светлоклеточный рак почки, АКТ сигнальный путь, m-TOR, PTEN, АКТ, GSK-3-beta, PDK1, c-Raf, p70 S6 киназа, 4E-BP1

Развитие и прогрессирование злокачественных новообразований тесным образом связано с активацией сигнальных систем, включающих транскрипционные и ростовые факторы, а также путей их регуляции [2,3]. В основе неопластической трансформации при раке почки лежат стабильные генетические повреждения, связанные с мутацией гена VHL (von Hippel-Lindau), которая приводит к повышенной экспрессии внутриклеточного фактора транскрипции HIF (hypoxia inducible factor). В ранее проведенных исследованиях было отмечено, что активация неоангиогенеза, связанная с повышением содержания фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF) и транскрипционного фактора HIF-1 α , тесным образом связана процессом метастазирования [1,2,14]. Напомним, что активация тирозинкиназных рецепторов, к которым, прежде всего, относится собственный рецептор VEGF - VEGFR2, приводит к стимуляции АКТ-сигнального пути.

PI3K/AKT/mTOR — один из универсальных сигнальных путей, характерных для большинства клеток, центральными компонентами которого являются ферменты фосфоинозитид-3-киназа (PI3K), киназы АКТ и m-TOR. Этот внутриклеточный каскад является ключевым в жизнедеятельности клетки, определяет ее рост, пролиферацию и апоптоз [6]. Активация проте-

инкиназы АКТ осуществляется при ее фосфорилировании. Данный процесс находится под контролем киназы PDK1 (Pyruvate dehydrogenase kinase) и ферментативного комплекса mTORC2, в который входят, помимо m-TOR, G β L, rictor (rapamycin-insensitive companion of TOR), mSin1 (mammalian stress-activated protein kinase (SAPK)-interacting protein 1) и protor (protein observed with rictor) [10].

Субстратами АКТ являются множество белков, участвующих в процессах роста, пролиферации клеток, а также их апоптозе. Среди них выделяют роль c-RAF (serine/threonine-protein kinase) и GSK-3-beta (glycogen synthase kinase-3-beta) [15]. АКТ также играет существенную роль в активации рапамицин-чувствительного комплекса mTORC1, состоящего из m-TOR, raptor (regulatory-associated protein of TOR), mLST8 (mammalian lethal with Sec13 protein 8), или G β L, и PRAS40 (proline-rich PKB/AKT substrate 40 kDa) [8].

Протеинкиназа m-TOR, как было описано выше, существует в клетке в качестве субъединицы внутриклеточных мультимолекулярных сигнальных комплексов mTORC1 и mTORC2 [11]. Важнейшими субстратами m-TOR в комплексе mTORC1 являются p70 S6 киназа (киназа рибосомального белка S6) и 4E-BP1 (иницирующий фактор, 4E связывающий протеин 1) [5,6,12], являющиеся ключевыми регуляторами трансляции мРНК и стимуляторами биосинтеза белков.

Активность АКТ сигнального пути находится под контролем фосфатазы PTEN [13]. Она катализирует отщепление фосфатной группы в положении 3D инозитольного кольца фосфатидилинозитол-3-фосфатов, тормозя передачу сигнала по PI3K/AKT/mTOR-сигнальному пути. К белковым субстратам PTEN относится также фосфатаза PHLPP (PH domain and Leucine rich repeat Protein Phosphatase), которая катализирует отщепление фосфатной группы по положению Ser-473 в молекуле АКТ. Повышение активности этого фермента приводит к активации апоптоза и замедлению пролиферации клеток

опухолей, что позволяет отнести ее к значимым белкам-онкосупрессорам [9].

В литературе имеются единичные, разрозненные данные о связи обсуждающихся молекул с особенностями роста и прогрессирования светлоклеточного рака почки [7, 10]. В связи с этим, цель исследования заключалась в изучении экспрессии компонентов АКТ сигнального пути, субстратов m-TOR в ткани рака почки в ассоциации с распространенностью злокачественного процесса.

Материалы и методы

В исследование включено 34 больных светлоклеточным раком почки $T_{1-4}N_{0-1}M_{0-1}$ (средний возраст $57,6 \pm 2,2$ лет). Больные были разделены на группы в зависимости от критерия T. В группу T_1 вошли 10 пациентов, T_2 – 14 и T_3 – 10 больных. Общая группа больных была также разделена на подгруппы в зависимости от наличия отдаленных метастазов. Локализованная форма заболевания ($T_{1-3}N_0M_0$) выявлена у 24 больных, диссеминированная – у 10. Объемы диагностики и лечения больных раком почки соответствовали рекомендуемым алгоритмам объемов диагностики и лечения злокачественных новообразований, утвержденным Министерством здравоохранения РФ. Проведение работы одобрено этическим комитетом Томского НИИ онкологии. Материалом для исследования служили образцы опухолевой и гистологически неизменной ткани, находящиеся на расстоянии не менее 1 см от границы опухолей, которые после взятия замораживались и хранились при -80°C .

Получение гомогенатов. Замороженную ткань (100 мг) гомогенизировали в жидком азоте, затем ресуспендировали в 300 мкл 50 mM трис-HCl буфера (pH=7,5), содержащего 2 mM АТФ, 5 mM хлорид магния, 1 mM дитиотреитол, 1mM ЭДТА и 100 mM хлорид натрия. Гомогенат центрифугировали 60 минут при 10000g и 4°C .

Электрофорез. Электрофорез проводили по Laemmli в 13% полиакриламидном геле. **Вестерн блоттинг.** После электрофореза осуществляли перенос полипептидов на PVDF-мембрану (Immobilon, Millipore, США). Иммунодетекцию проводили с антителами к phospho-PTEN (Ser380), АКТ (pan), phospho -АКТ (T308), phospho-GSK-3-beta

(Ser9), phospho-PDK1 (Ser241), phospho-c-Raf (Ser259), m-TOR, phospho-mTOR (Ser2448), phospho-p70 S6 киназа (Ser371), phospho-4E-BP1 (Thr37/46) (Cell Signaling, USA). Затем мембрану подвергали обработке системой хемилюминесцентной детекции ECL (GE Healthcare, Великобритания). Плотность полос оценивали с помощью компьютерной программы «ImageJ». Стандартизация проводилась относительно β -актина.

Статистическую обработку результатов проводили с применением пакета статистических программ Statistica 8.0. Достоверность различий между группами определяли с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни для независимых выборок. В таблицах все результаты представлены как медиана, а разброс значений как 25%-75% квартиль. Различия считались значимыми при $p < 0,05$. Наличие связи между изучаемыми показателями исследовали с использованием корреляционного анализа, для оценки силы связи между переменными рассчитывали коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r).

Результаты и обсуждение

В опухолевой ткани выявлено увеличение содержания общего АКТ (pan), phospho-GSK-3-beta, phospho-PDK1, phospho-c-Raf на 91,0%; 67,4%; 46,0% и 69,0%, соответственно, по сравнению с неизменной тканью (рис. 1). При изучении уровня серин/треониновой протеинкиназы m-TOR и ее субстратов в ткани рака почки отмечается увеличение ее общего содержания, а также фосфорилированной формы и ее субстрата phospho-4E-BP1 на 76,1%; 67,2% и 78,7%, соответственно, по сравнению с неизменной тканью (рис.2). Выявленный факт является свидетельством активации сигнального каскада АКТ в опухолевых клетках при участии m-TOR, что может сопровождаться изменениями в процессах апоптоза и пролиферации.

На следующем этапе исследования были изучены ассоциации между компонентами сигнального пути и субстратами m-TOR. При проведе-

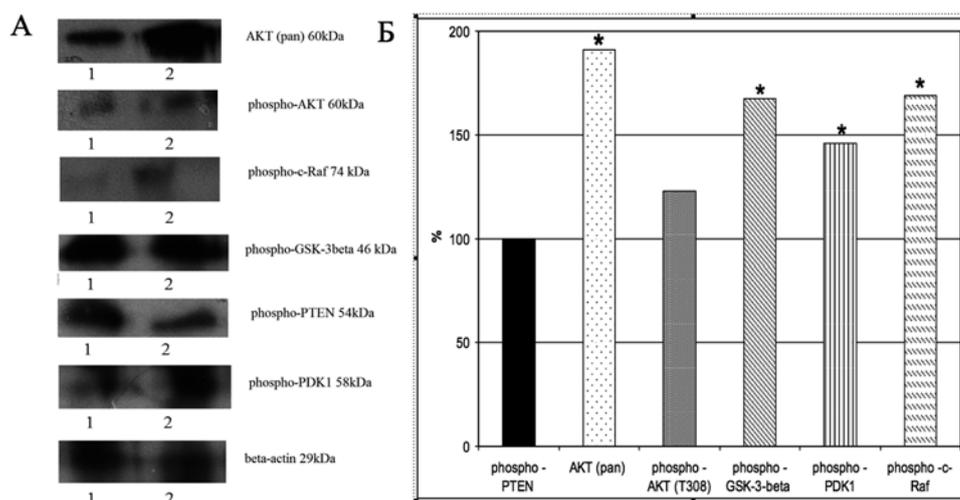


Рис. 1. А - Вестерн Блоттинг компонентов АКТ-сигнального пути: АКТ, phospho-PDK1, phospho-c-Raf, phospho-GSK-3beta и phospho-PTEN в опухолевой и неизменной ткани больных раком почки. Б – Экспрессия белков в % к ней в неизменной ткани.

Примечание: 1 – экспрессия белков в опухоли; 2 – экспрессия белков в неизменной ткани;

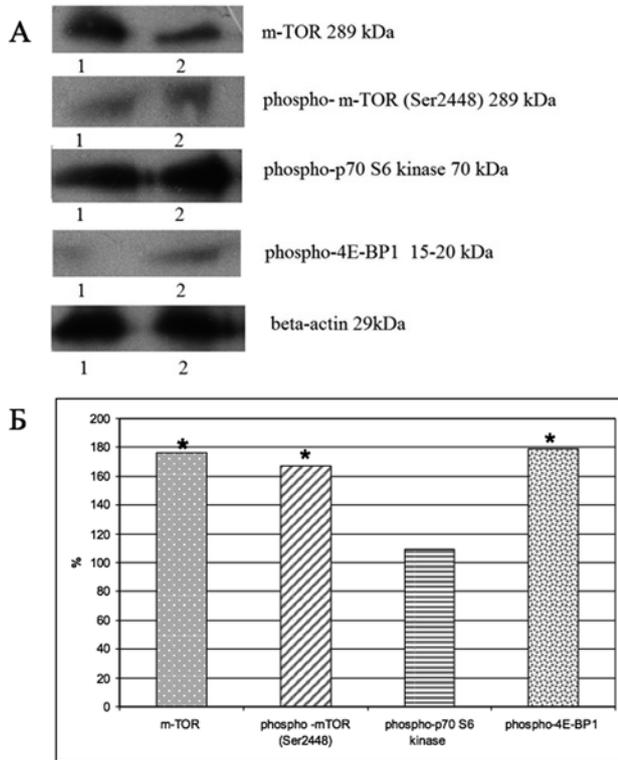


Рис. 2. Вестерн Блоттинг m-TOR и ее субстратов: phospho-p70 S6 киназы и phospho-4E-BP1 в опухолевой и неизмененной ткани больных раком почки.

Примечание: 1 – экспрессия белков в опухоли; 2 – экспрессия белков к ней в неизмененной ткани

нии корреляционного анализа были обнаружены значимые ассоциации между общим количеством АКТ, phospho-PTEN ($r=0,59$; $p=0,00058$) и phospho-4E-BP1 ($r=0,7$; $p=0,00015$), а также между экспрессией PDK1, phospho-m-TOR ($r=0,41$; $p=0,023$) и phospho-GSK-3-beta ($r=0,45$; $p=0,013$). Общее количество серин/треониновой протеинкиназы m-TOR было связано с количеством phospho-AKT ($r=0,46$; $p=0,01$). Полученные сведения подтверждают зависимость компонентов сигнального пути АКТ и субстратов m-TOR друг от друга. При этом большее значение придается уровню АКТ, ее фосфорилированной формы, за что отвечает фермент PDK1, а также серин/треониновой протеинкиназе m-TOR, регулятору обмена гликогена GSK-3-beta и ингибитору транскрипции 4E-BP1. Обращает на себя внимание наличие положительной зависимости между экспрессией phospho-m-TOR и общим количеством АКТ. Этот факт подтверждается тем, что ингибиторное влияние белка онкосупрессора-PTEN возможно только на активированную (фосфорилированную) форму протеинкиназы [9]. Вследствие этого, рост активности PTEN может приводить к увеличению общего содержания АКТ.

В табл. 1 представлены данные об экспрессии компонентов АКТ-сигнального пути в ткани опухоли больных в зависимости от стадии заболевания T и наличия отдаленных метастазов.

Таблица 1.
Экспрессия компонентов АКТ сигнального пути: АКТ, phospho-PDK1, phospho-c-Raf, phospho-GSK-3beta и phospho-PTEN в опухоли больных локализованным и диссеминированным раком почки

показатель	По критерию T			По критерию M	
	T ₁ , n=10	T ₂ , n=14	T ₃ , n=10	Локализованный рак почки, n=24	Диссеминированный рак почки, n=10
phospho -PTEN	104,8 (67,9-165,3)	110,3 (67,4-194,4)	83,3 (55,3-105,0)	99,7 (70,4-139,2)	55,3 (55,2-57,0)**
АКТ (pan)	170,0 (98,6-142,9)	168,4 (113,7-224,1)	284,5 (79,6-447,8)	139,95 (110,68-229,4)	160,35 (112,3-175,4)
phospho -АКТ (T308)	125,3 (73,2-150,4)	134,1 (83,1-210,9)	127,8 (101,0-114,0)	105,1 (76,1-156,58)	73,1 (55,9-84,7)**
phospho -GSK-3-beta	186,8 (116,7-267,5)	151,5 (100,1-227,0)	107,5 (78,5-107,3)	156,1 (106,85-250,5)	147,5 (97,4-196,9)
phospho -PDK1	177,7 (116,7-167,6)	150,9 (54,2-170,2)	95,6 (76,0-119,2)	132,0 (102,35-168,0)	119,2 (111,7-132,6)
phospho -c-Raf	126,3 (78,0-162,0)	164,0 (18,1-234,5)	286,9 (247,0-311,1)*	157,1 (102,9-240,75)	146,35 (75,8-164,9)

Примечание: * - значимость различий по сравнению с группой больных T₁, $p<0,05$;

** - значимость различий по сравнению с группой больных с локализованным раком, $p<0,05$;

Таблица 2.
Экспрессия m-TOR и ее субстратов: phospho-p70 S6 киназы и phospho-4E-BP1 в опухоли больных локализованным и диссеминированным раком почки

показатель	По критерию T			По критерию M	
	T ₁ , n=10	T ₂ , n=14	T ₃ , n=10	Локализованный рак почки, n=24	Диссеминированный рак почки, n=10
m-TOR	179,9 (68,8-193,0)	211,0 (154,5-260,4)	124,2 (50,7-194,1)	158,6 (90,35-218,0)	129,4 (78,8-138,4)
phospho -mTOR (Ser2448)	257,1 (106,4-318,9)*	123,0 (50,0-164,7)	108,8 (72,6-181,7)*	128,1 (93,0-205,6)	108,1 (81,7-160,4)
phospho-p70 S6 kinase	106,8 (66,7-95,0)	101,1 (67,5-117,7)	102,6 (31,2-195,5)	93,6 (67,1-117,8)	101,9 (39,0-173,7)
phospho-4E-BP1	107,1 (63,1-136,6)	141,1 (71,8-151,8)	266,7 (105,5-489,9)	131,0 (78,1-188,7)	128,0 (105,4-136,8)

Примечание: * - значимость различий по сравнению с группой больных со стадией T=1, $p<0,05$;

В результате проведенного исследования было выявлено увеличение уровня c-Raf в 2,2 раза у больных со стадией T₁ по сравнению с больными со стадией T₃. Известно, что активация Ras-Raf-ERK сигнального пути связана с развитием анти-апоптотического эффекта [4]. Вероятно, с увеличением размера первичной опухоли возрастает его выраженность, что в конечном итоге способствует опухолевой прогрессии. В свою очередь, исследование данных показателей у больных в зависимости от наличия метастазов заболевания позволило зарегистрировать значимое снижение уровня phospho-PTEN в 1,8 раза у пациентов диссеминированной формой опухоли по сравнению с больными без метастазов (табл. 1). PTEN является основным ингибитором АКТ-сигнального пути, его функциональная недостаточность связана с активацией процессов роста и распространения опухолевых клеток [5,12,13]. При этом стоит отметить, что уровень активированного АКТ - phospho-AKT снижался в 1,4 раза у больных с метастазирующими опухолями по сравнению с пациентами без метастазов. Вероятно, по мере развития заболевания поддержание активности сигнального каскада происходит при участии меньшего количества фермента АКТ.

При изучении экспрессии данной протеинкиназы и ее субстратов у больных раком почки в зависимости от критерия T и наличия метастазов выявлена связь активированной m-TOR с размером опухоли (табл.2). Показано снижение содержания phospho-m-TOR в 2,36 раза у больных в группе T₁ по сравнению с больными в группе T₃. При этом значимых изменений в экспрессии m-TOR, а также его субстратов – phospho-p70 S6 киназы, phospho-4E-BP1 в зависимости от размера опухоли и распространенности процесса не было выявлено (табл. 2). Вероятно, полученный факт отражает особенности жизнедеятельности клетки, когда в процессе онкогенеза активация основного сигнального каскада происходит за счет ограниченного количества phospho-m-TOR. В настоящее время имеются единичные сведения о связи экспрессии субстратов m-TOR с процессом метастазирования рака почки и клиническим течением заболевания [7,10]. По данным ряда авторов phospho-p70 S6 киназа и phospho-4E-BP1 могут претендовать на роль маркеров прогрессирования заболевания, а также молекулярных факторов, ассоциированных с плохим прогнозом заболевания. Однако, в проведенном исследовании их связь со стадией заболевания и процессом метастазирования выявлена не была.

Заключение

В опухолях почки зарегистрирована активация сигнального каскада АКТ с участием

m-TOR, что сопровождается ростом уровня протеиназы АКТ, ее фосфорилированной формы, серин/треониновой протеинкиназы m-TOR, регулятора обмена гликогена GSK-3-beta и ингибитора транскрипции 4E-BP1. Полученные данные подтверждены результатами корреляционного анализа. Выявлены маркеры, ассоциированные с размером первичной опухоли почки и развитием метастазов. К ним относят экспрессию c-Raf и phospho-m-TOR, PTEN, phospho-AKT. Полученные данные имеют значение как для понимания отдельных этапов онкогенеза при светлоклеточном раке почки, так и для поиска дополнительных маркеров прогноза течения заболевания.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ №МД-3637.2015.7

ЛИТЕРАТУРА

1. Спирина Л.В., Усынин Е.А., Кондакова И.В. и др. Экспрессия транскрипционных факторов, сосудистого эндотелиального фактора роста и активность внутриклеточных протеиназ у больных с локализованным и диссеминированным раком почки // Сиб. онкол. журнал. – 2014. – № 4. – С. 31–38.
2. Спирина Л.В., Кондакова И.В., Усынин Е.А. и др. Активность протеасом и содержание ростовых факторов при раке почки, мочевого пузыря и эндометрия // Росс. онкол. журнал. – 2010. – № 1. – С. 23 – 25.
3. Юнусова Н. В., Спирина Л. В., Кондакова И. В. и др. Связь экспрессии металлопротеиназы PAPP-A с экспрессией ростовых и транскрипционных факторов при раке эндометрия // Известия РАН. Сер. Биологическая. – 2013. - № 3. – С. 284-291.
4. Banejee P., Basu A., Datta D. et al. The heme oxygenase-1 protein is overexpressed in human renal cancer cells following activation of the Ras-Raf-ERK pathway and mediates anti-apoptotic signal // J Biol Chem. – 2011. – Vol. 286 (38). – P. 33580-33590.
5. Darwish O.M., Kapur P., Youssef R.F. et al. Cumulative number of altered biomarkers in mammalian target of rapamycin pathway is an independent predictor of outcome in patients with clear cell renal cell carcinoma // Urology. – 2013. – Vol. 81 (3). – P. 581-586.
6. Dodd K.M., Yang J., Shen M.H. et al. mTORC1 drives HIF-1 and VEGF-A signalling via multiple mechanisms involving 4E-BP1, S6K1 and STAT3 // Oncogene. – 2015. – Vol. 34 (17). – P. 2239-2250.
7. Fan L., Li P., Yin Z. et al. Ribosomal s6 protein kinase 4: a prognostic factor for renal cell carcinoma // Br. J. Cancer. – 2013. – Vol. 109 (5). – P. 1137-1146.
8. Figlin R. A., Kaufmann I., Borchiel J. Targeting PI3K and mTORC2 in metastatic renal cell carcinoma: New strategies for overcoming resistance to VEGFR and mTORC1 inhibitors // Int. J. Cancer. – 2013. – Vol. 133. – P. 788–796.
9. Gao T., Furnari F., Newton A. C. PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth // Mol. Cell. – 2005. – Vol. 18. – P. 13–24.
10. Hager M., Haufe H., Alinger B., Kolbitsch C. pS6 Expression in normal renal parenchyma, primary renal cell

- carcinomas and their metastases // *Pathol. Oncol. Res.* – 2012. – Vol. 18 (2). – P. 277-283.
11. Mendoza M.C., Er E.E., Blenis J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation // *Trends Biochem. Sci.* – 2011. – Vol. 36. – P. 320–328.
 12. Nishikawa M., Miyake H., Harada K., Fujisawa M. Expression of molecular markers associated with the mammalian target of rapamycin pathway in nonmetastatic renal cell carcinoma: Effect on prognostic outcomes following radical nephrectomy // *Urol. Oncol.* – 2014. – Vol. 32 (1). – P. 15-21.
 13. Schultz L., Chau A., Albadine R. et al. Immunoexpression status and prognostic value of mTOR and hypoxia-induced pathway members in primary and metastatic clear cell renal cell carcinomas // *Am. J. Surg. Pathol.* – 2011. – 35 (10). – P. 1549-1556.
 14. Spirina L.V., Kondakova I.V., Choynzonov E.L. et al. Expression of vascular endothelial growth factor and transcription factors HIF-1 and NF-κB expression in squamous cell carcinoma of head and neck; association with proteasome and calpains activity // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* – 2013. – Vol. 139. – P. 625-633.
 15. Thangavelu K., Pan C.Q., Karlberg T. et al. Structural basis for the allosteric inhibitory mechanism of human kidney-type glutaminase (KGA) and its regulation by Raf-Mek-Erk signaling in cancer cell metabolism // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2012. – Vol. 109 (20). – P. 7705-7710.

*L.V.Spirina^{1,2}, E.A.Usynin¹, I.V.Kondakova¹,
Z.A.Yurmazov¹, E.M.Slonimskaya^{1,2}, E.S.Kolegova¹*

Activation of AKT of signaling pathway and the level of mTOR substrates in tumor of patients with kidney cancer, connection with prevalence of malignancy

¹Research Institute of Oncology
²Siberian State Medical University
Tomsk

Activation of AKT signaling pathway and mTOR substrates of kidney tumor tissue occurs by improving AKT, its phosphorylated form, the serine / threonine protein kinase m-TOR, the exchange regulator glycogen GSK-3-beta and also the inhibitor of 4E-BP1 transcription. Increasing the size of primary tumor is followed by increasing the content of therein c-Raf and decreasing the content of phospho-m-TOR. The development of disseminated forms of the disease was associated with a reduction PTEN and phospho-AKT in tumor.

Key words: clear-cell renal cell carcinoma, AKT signaling pathway, m-TOR, PTEN, AKT, GSK-3-beta, PDK1, c-Raf, p70 S6 kinase, 4E-BP1

Поступила в редакцию 06.11.2015 г.