

УДК:617.51+617.53]-006.61-033.2:611-018.98:577.15:547.96

РОЛЬ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ПРОТЕИНАЗ В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ HIF-1 α , NF- κ B И ФАКТОРА РОСТА СОСУДОВ ПРИ ЛИМФОГЕННОМ МЕТАСТАЗИРОВАНИИ ПЛОСКОКЛЕТОЧНЫХ КАРЦИНОМ ГОЛОВЫ И ШЕИ**Евгений Лхаматцыренович ЧОЙНЗОНОВ, Людмила Викторовна СПИРИНА,
Ирина Викторовна КОНДАКОВА, Светлана Юрьевна ЧИЖЕВСКАЯ,
Дмитрий Александрович ШИШКИН, Денис Евгеньевич КУЛЬБАКИН***ФГБУ НИИ онкологии СО РАМН
634050, г. Томск, пер. Кооперативный, 5*

С целью изучения экспрессии транскрипционных факторов NF- κ B, HIF-1 α и VEGF, особенностей их регуляции при лимфогенном метастазировании плоскоклеточных карцином головы и шеи обследовано 66 пациентов с морфологически верифицированным диагнозом (T₂₋₃N₀₋₂). Экспрессия транскрипционных факторов и VEGF исследована иммуноферментным методом, активность протеасом и кальпаинов – флуориметрически. Субъединичный состав протеасом определяли методом вестерн-блоттинга. В результате проведения исследования выявлена связь лимфогенного метастазирования опухолей головы и шеи с экспрессией ядерного фактора NF- κ B p50 и с содержанием LMP2-субъединицы протеасом.

Ключевые слова: транскрипционные факторы NF- κ B и HIF-1 α , фактор роста эндотелия сосудов, протеасома, кальпаины, плоскоклеточные карциномы головы и шеи.

Плоскоклеточные карциномы головы и шеи (ПКГШ) относятся к числу социально значимых онкологических заболеваний. Несмотря на то, что ПКГШ являются опухолями наружной локализации, они характеризуются высокой агрессивностью, связанной с анатомо-топографическими особенностями, бессимптомным течением и высокой агрессивностью заболевания [24]. Известно, что биологическое поведение опухоли определяет развитие и прогрессирование заболевания, однако молекулярный патогенез ПКГШ исследован недостаточно. К числу патогенетически важных молекул относятся ростовые и транскрипционные факторы [3, 27, 28].

Гипоксический фактор транскрипции HIF-1 является гетеродимером, состоящим из α - и β -субъединиц. β -Субъединицы конститутивны;

активность фактора в условиях гипоксии зависит главным образом от экспрессии и посттрансляционной модификации α -субъединиц [16]. Непосредственным следствием активации транскрипционного фактора HIF-1 α является продукция сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), который обеспечивает интенсивный рост сосудов, что, в свою очередь, создает условия для метастазирования и распространения опухоли [20].

Ключевым фактором транскрипции, связанным с процессами апоптоза и контролем пролиферации клеток, служит NF- κ B (nuclear factor kappa B). NF- κ B активен только в димерной форме, наиболее распространены димеры субъединиц p50 или p52 с субъединицей p65 [13]. Соотношение p65 к p50 менее единицы может

Чойнзонов Е.Л. – д.м.н., проф., академик РАМН, директор, e-mail: nii@oncology.tomsk.ru

Спирин Л.В. – к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории биохимии опухолей, e-mail: spirinalv@oncology.tomsk.ru

Кондакова И.В. – д.м.н., проф., зав. лабораторией биохимии опухолей, e-mail: kondakova@oncology.tomsk.ru

Чижевская С.Ю. – к.м.н., старший научный сотрудник отделения опухолей головы и шеи, e-mail: nii@oncology.tomsk.ru

Шишкин Д.А. – к.м.н., старший научный сотрудник отделения опухолей головы и шеи, e-mail: nii@sibmail.com

Кульбакин Д.Е. – младший научный сотрудник отделения опухолей головы и шеи, e-mail: nii@oncology.tomsk.ru

свидетельствовать о синтезе функционально неактивных димеров NF-κB [9]. Взаимное влияние транскрипционных факторов свидетельствует о наличии сложной системы регуляции их уровня. В настоящее время установлено влияние NF-κB на экспрессию транскрипционного фактора HIF-1α и его активацию [28].

Развитие и прогрессирование злокачественных новообразований области головы и шеи тесно связано с экспрессией транскрипционных и ростовых факторов. Высокая экспрессия HIF-1α, наблюдаемая в ткани ПКГШ, сочетается с повышением уровня VEGF, с увеличением плотности микрососудов и распространением опухоли на регионарные лимфоузлы [19]. Выявлено, что экспрессия транскрипционного фактора NF-κB также повышена в случае плоскоклеточного рака гортани по сравнению с неизмененным эпителием и связана со стадией заболевания [14]. В свою очередь применение ингибиторов NF-κB на культуре плоскоклеточного рака приводит к снижению экспрессии проангиогенных пептидов, в том числе и VEGF [30].

Одним из механизмов регуляции содержания транскрипционных факторов NF-κB и HIF-1α является внутриклеточный протеолиз, который осуществляется внутриклеточными протеиназами, к числу которых относят протеасомы и кальпаины [5]. Протеасомы представляют собой мультиферментативные каталитические комплексы, в которых происходит деградация до 80 % собственных белков клетки. Они представлены двумя пулами: 26S- и 20S-протеасомами. Активность протеасом тесно связана с их субъединичным составом. Известно, что появление иммунных типов (LMP7, LMP2, RA28) субъединиц в составе протеасом связано с изменением их ферментативной активности [4]. В настоящее время активно изучается роль протеасом в патогенезе злокачественных образований различных локализаций, в частности, молочной железы [7], кишечника [29], а также плоскоклеточных карцином головы и шеи [8, 17]. Активация системы протеасом показана при развитии опухолей головы и шеи, что сопровождается структурными изменениями в их субъединичном составе [2]. Семейство кальций-зависимых протеиназ представлено кальпаинами, из которых наиболее изучены и распространены кальпаин-1 и 2 [11]. Известно, что экспрессия кальпаинов повышается в случае плоскоклеточного рака кожи [23].

В настоящее время широко изучается вопрос протеолитической регуляции экспрессии транскрипционных и ростовых факторов внутриклеточными протеиназами. Известно, что снижение

деградации HIF-1α при использовании ингибиторов протеасом или при гипоксии приводит к значительному повышению экспрессии VEGF в опухолевых клетках [31]. Активация транскрипционного фактора NF-κB также осуществляется протеасомами [5]. В отсутствие стимулирующих сигналов NF-κB находится в цитоплазме в ассоциации с ингибитором (IκB). Ключевым этапом активации NF-κB являются освобождение его из комплекса с IκB и протеасомная деградация последнего [15]. В настоящее время показано, что в определенных условиях разрушение ингибитора IκB возможно при участии кальпаинов [18]. Дополнительным механизмом регуляции служит посттрансляционная модификация p105 – предшественника NF-κB p50, которая также осуществляется с помощью протеасом [22].

На сегодняшний день протеолитическая регуляция экспрессии транскрипционных и ростовых факторов, их взаимное влияние в злокачественных опухолях ПКГШ изучены недостаточно. В частности, нет понимания особенностей функционирования протеаз и регуляции ими транскрипционных факторов и VEGF при метастазировании. Цель настоящего исследования заключалась в изучении экспрессии транскрипционных факторов NF-κB, HIF-1α и сосудистого эндотелиального фактора роста, особенностей их протеолитической регуляции в ткани плоскоклеточных карцином области головы и шеи и при лимфогенном метастазировании.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование включены 66 пациентов (средний возраст $57,1 \pm 1,7$ года) с морфологически верифицированным диагнозом плоскоклеточного рака области головы и шеи T₂₋₃N₀₋₂, в том числе 25 больных раком гортани и гортаноглотки, 23 пациента с опухолями ротовой полости и 18 больных с раком языка. Объемы диагностики (Международная классификация стадий развития раковых опухолей TNM 2009 г.) и лечения больных соответствовали рекомендуемым алгоритмам объемов диагностики и лечения злокачественных новообразований, утвержденным Министерством здравоохранения и социального развития РФ. Всем пациентам проведено хирургическое иссечение опухоли. При наличии регионарных метастазов выполняли фасциально-футлярное иссечение шейной клетчатки, операцию Кайла. Проведение данной работы одобрено этическим комитетом ФГБУ «НИИ онкологии» СО РАМН, получено информированное согласие от каждого пациента.

Материалом для исследования протеасом явились образцы опухолевой и гистологически

неизменной ткани, находящиеся на расстоянии не менее 2 см от границы опухолей, которые были получены при выполнении радикального оперативного вмешательства. Весь материал проходил гистологическую верификацию. Образцы тканей замораживались и хранились при -80°C .

Приготовление ядерных экстрактов для определения содержания NIF-1 α и NF- κ B (форм p50 и p65) проводилось в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя Caymanchem (США). Замороженную ткань (100 мг) гомогенизировали в жидком азоте, затем ресуспендировали в 300 мкл 50 мМ трис-НСl буфера (рН 7,5), содержащего 2 мМ АТФ, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ дитиотреитола, 1 мМ ЭДТА и 100 мМ NaCl. Гомогенат центрифугировали при 2400g и 4 $^{\circ}\text{C}$ ("Eppendorf", Германия) для получения осадка, который ресуспендировали в 50 мкл 50 мМ Трис-НСl буфера (рН 7,5), состоящего из 2 мМ АТР, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ дитиотреитола, 1 мМ ЭДТА и 100 мМ NaCl, и затем центрифугировали при 14000g и 4 $^{\circ}\text{C}$. Полученный супернатант использовали для определения экспрессии транскрипционных факторов.

Определение содержания транскрипционных факторов. Экспрессию активированных форм NF- κ B p50, p65 и NIF-1 α определяли в ядерных экстрактах иммуоферментным методом с помощью наборов Caymanchem (США). Содержание белка в гомогенатах и ядерных экстрактах измеряли по методу Лоури [21]. Результаты определения содержания ростовых факторов выражали в нг/мг белка, а транскрипционных факторов – в условных единицах на 1 мг белка в лунке.

Получение осветленных гомогенатов. Замороженную ткань (100 мг) гомогенизировали в жидком азоте, затем ресуспендировали в 300 мкл 50 мМ трис-НСl буфера (рН 7,5), содержащего 2 мМ АТФ, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ дитиотреитола, 1 мМ ЭДТА и 100 мМ NaCl. Гомогенат центрифугировали 60 минут при 10000g и 4 $^{\circ}\text{C}$, надосадочную фракцию отбрасывали.

Фракционирование протеасом. Все процедуры проводили при 4 $^{\circ}\text{C}$. Белки осветленных гомогенатов фракционировали с помощью сульфата аммония в два этапа. Фракцию, обогащенную 26S-протеасомами, получали добавлением сульфата аммония до 40 % насыщения, фракцию 20S-протеасом – добавлением сульфата аммония до 70 % насыщения [1]. В полученных фракциях определяли активность протеасом.

Определение активности протеасом. Химотрипсинподобную активность общего пула протеасом, 26S- и 20S-пулов определяли в ос-

ветленных гомогенатах опухолевых и неизменных тканей, а также во фракциях протеасом, по гидролизу флуорогенного олигопептида N-сукцинил-Leu-Leu-Val-Tyr-7-амидо-4-метилкумарина (Suc-LLVY-AMC, Sigma, США) химотрипсинподобными центрами протеасом [6], используя 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-НСl (рН 7,5), 1 мМ дитиотреитола, 30 мкМ Suc-LLVY-AMC. Для определения активности 26S-протеасом в реакционную смесь дополнительно вводили 5 мМ хлорида магния и 1 мМ АТФ. Реакцию проводили при 37 $^{\circ}\text{C}$ в течение 20 мин и останавливали 1%-м додецилсульфатом натрия. Для оценки активности примесных протеаз в образцах применяли специфический ингибитор протеасом MG132 (Sigma, США). Удельную активность протеасом выражали в единицах активности на 1 мг белка, за единицу активности (МЕ) принимали количество фермента, при котором гидролизуется 1 нмоль Suc-LLVY-AMC в течение 1 мин. Содержание белка определяли по методу Лоури [21].

Определение активности кальпаинов. Активность кальпаинов определяли в осветленных гомогенатах тканей по гидролизу Suc-LLVY-AMC [25], используя флуориметр «Hitachi-850» при длине волны возбуждения 380 нм и эмиссии 440 нм. Реакционная смесь содержала 100 мМ Tris-НСl (рН 7,3), 145 мМ NaCl. Реакцию проводили, добавляя к 30 мкМ Suc-LLVY-AMC, растворенного в реакционной смеси, 5 мкл супернатанта и инкубируя при 25 $^{\circ}\text{C}$ в течение 30 мин в присутствии или в отсутствие 10 мМ CaCl₂, 50 мкМ ингибитора N-ацетил-Leu-Leu-норлейцина (Sigma, США).

Электрофорез. Электрофорез проводили по Laemmli в 13%-м полиакриламидном геле. Пробы наносили в буфере, содержащем 0,0625M трис-НСl (рН 6,8), 2 % додецилсульфата натрия, 5 % 2-меркаптоэтанола, 10 % глицерина, 0,01 % бромфенолового синего.

Вестерн-блоттинг. После электрофореза белков осуществляли перенос полипептидов на нитроцеллюлезную мембрану Hybond-ECL (Amersham, США). Мембрану инкубировали в течение 2 часов при 20 $^{\circ}\text{C}$ в буфере TNT, содержащем 10 мМ Tris-НСl (рН 7,5), 150 мМ NaCl, 0,1 % Tween-20. Затем мембрану инкубировали в том же буфере, содержащем 5%-е обезжиренное молоко или моноклональные антитела к субъединицам α 1 α 2 α 3 α 5 α 6 α 7, LMP7, Rpt6 и поликлональные антитела к субъеди-

ницам LMP2 и PA28 β протеасом в разведении 1 : 2500, отмывали несколько раз буфером TNT и инкубировали в течение 1 ч в буфере TNT с 5%-м обезжиренным молоком и антителами к IgG мыши, конъюгированными с пероксидазой, в разведении 1 : 10000. После отмывки мембрану подвергали стандартной обработке системой хемиллюминесцентной детекции белков (Amersham, США). Плотность полос была определена с помощью стандартной компьютерной программы «Image J». Результаты были стандартизированы по содержанию актина в пробе и выражали в процентах от содержания субъединиц протеасом в неизменной ткани, которое принимали за 100 %.

Статистическая обработка. Результаты представлены как медиана (Me) с интерквартильным размахом (25-й и 75-й процентиля, Q₁–Q₃). Значимость различий между группами исследовали с помощью критерия Манна–Уитни, а также с помощью многомерного непараметрического дисперсионного анализа, рангового теста Краскела–Уоллиса и медианного теста. Корреляционный анализ проведен с использованием непараметрического критерия Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Показано, что экспрессия NF- κ B зависела от наличия метастазов в регионарные лимфоузлы (табл. 1), причем эта зависимость носила сложный волнообразный характер. Выявлено, что экспрессия субъединицы NF- κ B p50 у больных со стадией T₂₋₃N₁ в 2,9 раза выше, чем у пациентов со стадией T₂₋₃N₀. Дальнейшее увеличение количества пораженных лимфоузлов сопровождалось снижением экспрессии NF- κ B p50: у больных со стадией T₂₋₃N₂ содержание фактора снижалось по сравнению с больными со стадией T₂₋₃N₁. Экспрессия активированной формы NF- κ B p65 при поражении лимфатических узлов имела тенденцию к повышению.

Волнообразная динамика изменения содержания ядерного фактора NF- κ B была выявлена и для коэффициента NF- κ B p65/p50. Данный показатель был меньше у больных со стадией T₂₋₃N₁, чем у больных без поражения лимфоузлов, и составлял 0,6. В группе пациентов T₂₋₃N₂ коэффициент NF- κ B p65/p50 повышался до 2,5. Содержание VEGF и HIF-1 α при прогрессировании заболевания имело тенденцию к увеличению у больных с поражением регионарных лимфоузлов по сравнению с больными со стадией T₂₋₃N₀.

В целом полученные данные согласуются с представлениями о том, что экспрессия ядерных и ростовых факторов является важным маркером прогрессирования ПКГШ [19]. Колебание содержания субъединицы p50 NF- κ B, вероятно, имеет существенное значение в механизме лимфогенного распространения опухоли и может быть связано с функционированием протеасом, которые осуществляют активацию фактора [22]. Для подтверждения связи экспрессии транскрипционных факторов NF- κ B p65, p50, HIF-1 α и ростового фактора VEGF с интенсивностью внутриклеточного протеолиза было проведено определение активности протеолитических систем – протеасом и кальпаинов, а также анализ субъединичного состава протеасом.

Поражение регионарных лимфоузлов сопровождается ростом активности протеасом (табл. 2). В ткани ПКГШ наблюдалось увеличение общей активности протеасом у больных со стадией T₂₋₃N₂ по сравнению с больными со стадией T₂₋₃N₁ в 1,6 раза, что сопровождалось снижением экспрессии LMP2 субъединицы протеасом в 1,4 раза. Экспрессия LMP2 субъединицы протеасом тесно связана с уровнем убиквитинированных белков, а также с дефектами иммунного ответа, что свидетельствует о ее влиянии на активность протеасом и презент-

Таблица 1

Связь экспрессии транскрипционных факторов и сосудистого эндотелиального фактора роста с поражением регионарных лимфоузлов при плоскоклеточном раке головы и шеи, Me (Q₁–Q₃)

Показатель		Группа больных		
		T ₂₋₃ N ₀ , n = 11	T ₂₋₃ N ₁ , n = 6	T ₂₋₃ N ₂ , n = 6
Экспрессия транскрипционных факторов, усл. ед./мг белка в лунке	NF- κ B p50	6,6 (2,2–17,0)	19,7 (11,8–30,8)*	5,2 (2,8–7,8)**
	NF- κ B p65	9,2 (5,9–14,4)	12,5 (10,7–16,7)	8,7 (7,0–19,4)
	NF- κ B p65/p50	1,6 (0,7–3,3)	0,6 (0,5–0,8)	2,5 (1,7–3,2)**
	HIF-1 α	7,8 (4,6–21,1)	10,9 (10,8–16,7)	9,0 (6,5–14,6)
Экспрессия VEGF, пг/мг белка		71,1 (48,2–87,7)	92,1 (84,5–98,7)	74,5 (65,2–88,8)

Примечание. Здесь и в табл. 2 отличие статистически значимо ($p < 0,05$): * – от величины соответствующего показателя больных группы T₂₋₃N₀, ** – от величины соответствующего показателя больных группы T₂₋₃N₁.

Связь активности протеасом, их субъединичного состава и активности кальпаинов с поражением регионарных лимфоузлов при плоскоклеточном раке головы и шеи, Me (Q_1 – Q_3)

Показатель		Группа больных		
		T ₂₋₃ N ₀ , n = 36	T ₂₋₃ N ₁ , n = 20	T ₂₋₃ N ₂ , n = 10
Активность протеасом, ×1000 МЕ/мг белка	Общая активность	58,1 (43,1–117,1)	43,5 (31,5–68,0)	94,4 (60,0–268,3)**
	26S	20,0 (14,8–38,0)	21,6 (13,3–35,9)	34,0 (11,1–47,8)
	20S	45,9 (35,5–87,0)	35,9 (17,5–62,5)	45,0 (33,3–87,0)
Содержание субъединиц протеасом в опухолевой ткани в % от такового в неизменной ткани	$\alpha 1\alpha 2\alpha 3\alpha 5\alpha 6\alpha 7$	83,5 (58,3–91,8)	81,0 (56,3–96,0)	62,3 (10,0–81,7)
	LMP7	138,6 (89,0–211,9)	184,1 (116,6–276,9)	172,8 (84,2–300,0)
	LMP2	143,1 (105,4–167,1)	154,5 (11,3–194,3)	110,1 (81,1–138,5)**
	PA28 β	128,5 (105,4–168,3)	120,1 (104,2–163,9)	116,0 (98,2–180,0)
	rpt6	151,5 (101,0–222,8)	128,6 (95,0–194,4)	157,9 (112,0–305,3)
Активность кальпаинов, ×1000 МЕ/мг белка		119,0 (66,2–245,2)	142,4 (56,6–345,0)*	204,7 (74,0–335,5)**

тацию ими комплекса гистосовместимости I класса [12]. Активность других внутриклеточных протеиназ – кальпаинов – увеличивалась у больных со стадией T₂₋₃N₁ и T₂₋₃N₂ соответственно в 1,4 и 1,7 раза по сравнению с величиной показателя у пациентов без поражения регионарных лимфоузлов.

Следует отметить, что изменения активности протеасом и экспрессии транскрипционных факторов и VEGF при поражении регионарных лимфоузлов носили противоположный характер и при максимальной активности протеасом на стадии T₂₋₃N₂ отмечено минимальное содержание транскрипционных факторов, что свидетельствует о регуляции их содержания протеасомами. В целом динамика изменения экспрессии субъединиц протеасом в процессе метастазирования была разнонаправленной, при этом изменения содержания субъединицы протеасом LMP2 и транскрипционных факторов носили однонаправленный характер. Была исследована связь лимфогенного метастазирования с экспрессией транскрипционных факторов, VEGF и активностью внутриклеточных протеиназ методом непараметрического дисперсионного анализа. Ранговый тест Краскела–Уоллиса показал зависимость стадии N заболевания от экспрессии NF-кВ p50 ($p = 0,05$) и общей активности протеасом ($p = 0,05$), а медианный тест – от уровня LMP2-субъединицы протеасом ($p = 0,05$), что свидетельствует о вовлеченности этих показателей в развитие регионарных метастазов.

Анализ полученных результатов показал существование связей между общей активностью протеасом и экспрессией субъединицы NF-кВ p65 ($r = 0,6$, $p = 0,001$), а также между активностью 20S-протеасом и содержанием NF-кВ p50 ($r = 0,58$, $p = 0,004$), NF-кВ p65 ($r = 0,45$,

$p < 0,05$). Показана связь между экспрессией фактора HIF-1 α и содержанием VEGF ($r = 0,4$, $p = 0,04$). В работе А.Л. Goldberg выявлено влияние транскрипционного фактора NF-кВ на экспрессию HIF-1 α [10]. В нашем исследовании концентрация NF-кВ p50 и NF-кВ p65 в ткани ПКГШ зависела от экспрессии HIF-1 α ($r = 0,65$, $p = 0,0001$ и $r = 0,62$, $p = 0,002$ соответственно). При этом обнаружена связь экспрессии VEGF с содержанием NF-кВ p50 ($r = 0,4$, $p = 0,036$), что, вероятно, опосредуется через изменение уровня ядерного фактора HIF-1.

Активация протеасомной системы, вероятно, имеет преимущественное значение в развитии лимфогенного метастазирования злокачественных опухолей головы и шеи за счет наличия множественных уровней контроля транскрипционных и ростовых факторов. Известно, что ключевым этапом активации NF-кВ являются освобождение его из комплекса с ингибитором IкВ и последующая протеасомная деградация последнего [15, 26]. Несомненную роль в регуляции уровня транскрипционного фактора играет посттрансляционная модификация предшественников ядерного фактора, которая осуществляется в протеасомах [22]. В представленном исследовании связь экспрессии NF-кВ p65 и NF-кВ p50 с активностью протеасом выявлена в случае плоскоклеточного рака области головы и шеи.

Неоангиогенез является важным процессом, определяющим развитие опухоли, его активность тесно связана с экспрессией транскрипционного фактора HIF-1 α , деградация которого происходит в протеасомах. Однако для ПКГШ непосредственной связи между активностью протеасом и экспрессией HIF-1 не обнаружено. Наличие тесных зависимостей между экс-

прессией NF-κB, активируемого протеасомами, и IκB-1α позволяет сделать предположение о возможной регуляции процесса неоплазии транскрипционным фактором NF-κB.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В процессе развития и метастазирования опухолей головы и шеи происходит изменение экспрессии транскрипционного фактора NF-κB p50, что связано с активацией внутриклеточных протеиназ и с изменением субъединичного состава протеасом. Полученные результаты позволили выявить взаимосвязь между активностью протеасом и содержанием транскрипционных факторов в плоскоклеточных карциномах головы, а именно между экспрессией ядерных факторов NF-κB и общей активностью протеасом, а также активностью 20S-пула. В целом изучение данных белков в контексте прогрессирования опухолей головы и шеи может служить основой не только поиска новых маркеров течения заболевания, но и разработки новых подходов молекулярно-направленной терапии опухолей.

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

1. *Абрамова Е.Б., Астахова Т.М., Ерохов П.А. и др.* Множественность форм протеасомы и некоторые подходы к их разделению // Изв. РАН. Сер. Биол. 2004. (2). 150–156.
2. *Спирина Л.В., Кондакова И.В., Чойнзонов Е.Л. и др.* Активность и субъединичный состав в плоскоклеточных карциномах головы и шеи // Бюл. эксперим. биол. мед. 2010. 149. (1). 89–92.
3. *Спирина Л.В., Бочкарева Н.В., Кондакова И.В. и др.* Регуляция инсулиноподобных факторов роста и NF-κB протеасомной системой при раке эндометрия // Молек. биол. 2012. 46. (3). 452–461.
4. *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. 3983–3996.
5. *Baud V., Derudder E.* Control of NF-κB activity by proteolysis // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2011. 349. 97–114.
6. *Ben-Shahar S., Komlosch 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. 21963–21972.
7. *Chen C., Seth A.K., Aplin A.E.* Genetic and expression aberrations of E3 ubiquitin ligases in human breast cancer // *Mol. Cancer Res.* 2006. 4. 695–707.
8. *Chen Z., Ricker J.L., Malhotra P.S. et al.* Differential bortezomib sensitivity in head and neck cancer lines corresponds to proteasome, nuclear factor-κB and activator protein-1 related mechanisms // *Mol. Cancer Ther.* 2008. 7. (7). 1949–1960.
9. *Conner J.R., Smirnova I.I., Moseman A.P. et al.* IRAK1BP1 inhibits inflammation by promoting nuclear translocation of NF-κB p50 // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. 107. (25). 11477–11482.
10. *Goldberg A.L.* Functions of the proteasome: from protein degradation and immune surveillance to cancer therapy // *Biochem. Soc. Trans.* 2007. 35. 12–17.
11. *Goll D.E., Thompson V.F., Li H. et al.* The calpain system // *Physiol. Rev.* 2002. 83. 731–801.
12. *Hensley S.E., Zanker D., Dolan B.P. et al.* Unexpected role for the immunoproteasome subunit LMP2 in antiviral humoral and innate immune responses // *J. Immunol.* 2010. 184. (8). 4115–4122.
13. *Hoffmann A., Baltimore D.* Circuitry of nuclear factor kappaB signaling // *Immunol. Rev.* 2006. 210. 171–186.
14. *Jiang L.Z., Wang P., Deng B. et al.* Overexpression of Forkhead Box M1 transcription factor and nuclear factor-κB in laryngeal squamous cell carcinoma: a potential indicator for poor prognosis // *Hum. Pathol.* 2011. 42. (8). 1185–1193.
15. *Juvekar A., Manna S., Ramaswami S. et al.* Bortezomib induces nuclear translocation of IκBα resulting in gene-specific suppression of NF-κB-dependent transcription and induction of apoptosis in CTCL // *Mol. Cancer Res.* 2011. 9. (2). 183–194.
16. *Klatte T., Seligson D.B., Riggs S.B. et al.* Hypoxia-inducible factor 1 alpha in clear cell renal cell carcinoma // *Clin. Cancer Res.* 2007. 13. 7388–7393.
17. *Li C., Li R., Grandis J. R. et al.* Bortezomib induces apoptosis via Bim and Bik up-regulation and synergizes with cisplatin in the killing of head and neck squamous cell carcinoma cells // *Mol. Cancer Ther.* 2008. 7. (6). 1647–1655.
18. *Li C., Chen S., Yue P. et al.* Proteasome inhibitor PS-341 (bortezomib) induces calpain-dependent IκB(α) degradation // *J. Biol. Chem.* 2010. 285. (21). 16096–16104.
19. *Liang X., Yang D., Hu J. et al.* Hypoxia inducible factor-1α expression correlates with vascular endothelial growth factor-C expression and lymphangiogenesis/angiogenesis in oral squamous cell carcinoma // *Anticancer Res.* 2008. 28. 1659–1666.
20. *Linder C., Linder S., Munck-Wikland E. et al.* Evaluation of tissue and serum VEGF in patients with head and neck carcinoma // *Angiogenesis.* 1999. 2. 365–372.
21. *Lowry O., Rosebrough W., Farr A., Randall R.* Protein measurement with folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* 1951. 193. 265–275.

22. Moorthy A.K., Savinova O.V., Ho J.Q. et al. The 20S proteasome processes NF- κ B1 p105 into p50 in a translation-independent manner // EMBO J. 2006. 25. (9). 1945–1956.
23. Reichart J., Welter C., Mitschele T. et al. Different expression patterns of calpain isozymes 1 and 2 (CAPN1 and 2) in squamous cell carcinomas (SCC) and basal cell carcinomas (BCC) of human skin // J. Pathol. 2003. 199. (4). 509–516.
24. Ridge J.A., Glisson B.S., Lango M.N. et al. Head and neck tumors // Cancer management: 14th edition. <http://www.cancernetwork.com/cancer-management/head-and-neck/article/10165/1802498>
25. Sandmann S., Prenzel F., Shaw L. et al. Activity profile of calpains I and II in chronically infarcted rat myocardium-influence of the calpain inhibitor CAL 9961 // Br. J. Pharmacol. 2002. 135. (8). 1951–1958.
26. Schmitz M.L., Bacher S., Kracht M. I κ B-independent control of NF- κ B activity by modulatory phosphorylations // Trends Biochem. Sci. 2001. 26. 186–190.
27. Spirina L.V., Yunusova N.V., Kolomiets L.A. et al. Association of growth factors, HIF-1 and NF- κ B expression with proteasomes in endometrial cancer // Mol. Biol. Rep. 2012. 39. (9). 8655–8662.
28. Uden P., Kenneth N.S., Rocha S. Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by NF- κ B // J. Biochem. 2008. 412 (3). 477–484.
29. Voutsadakis I.A. Pathogenesis of colorectal carcinoma and therapeutic implications: the role of the ubiquitin-proteasome system and Cox-2 // J. Cell. Mol. Med. 2007. 11(2). 252–337.
30. Yan M., Xu Q., Zhang P. et al. Correlation of NF- κ B signal pathway with tumor metastasis of human head and neck squamous cell carcinoma // BMC Cancer. 2010. 10. 437.
31. Yue C.X., Ma J., Zhou H.J. The effect of RhoA and proteasome inhibitor MG132 on angiogenesis in tumors // Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2011. 42. (4). 445–501.

THE ROLE OF INTRACELLULAR PROTEINASES IN REGULATION OF THE HIF-1 α , NF- κ B TRANSCRIPTION FACTORS EXPRESSION AND VEGF AT LYMPHATIC CANCER SPREAD OF SQUAMOUS CELL CARCINOMA OF HEAD AND NECK

Evgeni Lkhamatserenovich CHOINZONOV, Lyudmila Viktorovna SPIRINA, Irina Viktorovna KONDAKOVA, Svetlana Yurevna CHIZHEVSKAYA, Dmitri Aleksandrovich SHISHKIN, Denis Evgenevich KULBAKIN

*FSBI Research Institute for Pharmacology SB RAMS
634050, Tomsk, Kooperativny lane, bd. 5*

Aim of the study was to determine the NF- κ B, HIF-1 α и VEGF expression, their characteristics in lymph node metastasis development of squamous cell carcinoma of head and neck. Material and methods: 66 patients with squamous cell carcinoma of head and neck (T₂₋₃N₀₋₂). Transcription factors and VEGF expression was measured by ELISA kits. Proteasome and calpain activity was determined using specific fluorogenic substrate. Proteasome subunits composition was measured by Western Blot Analysis. Results and discussion. The obtained data revealed the association of lymph node metastasis development with NF- κ B p50 expression and LMP2 proteasome subunits content.

Key words: transcription factors NF- κ B and HIF-1 α , VEGF, proteasome, calpain, squamous cell carcinoma of head and neck.

Choinzonov E.L. – doctor of medical sciences, professor, academician of RAMS, director,
e-mail: nii@oncology.tomsk.ru

Spirina L.V. – candidate of medical sciences, senior researcher of laboratory of tumor biology,
e-mail: spirinalv@oncology.tomsk.ru

Kondakova I.V. – doctor of medical sciences, professor, head of laboratory of tumor biochemistry,
e-mail: kondakova@oncology.tomsk.ru

Chizhevskaya S.Yu. – candidate of medical sciences, senior researcher of head and neck cancer department,
e-mail: nii@oncology.tomsk.ru

Shishkin D.A. – candidate of medical sciences, senior researcher of head and neck cancer department,
e-mail: nio@sibmail.com

Kulbakin D.E. – junior researcher of head and neck cancer department, e-mail: nii@oncology.tomsk.ru