

ОЦЕНКА КОМПОНЕНТОВ АКТ/mTOR-СИГНАЛЬНОГО ПУТИ В ТКАНИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ПОЧКИ И ИХ СВЯЗИ С МЕТАСТАЗИРОВАНИЕМ

DOI: 10.17691/stm2019.11.4.08

УДК 577.343:577.112:616.61-006.6

Поступила 27.09.2018 г.



Л.В. Спирина, д.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии опухолей¹; профессор кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики²;
Е.А. Усынин, к.м.н., старший научный сотрудник отделения общей онкологии¹; доцент кафедры онкологии²;
З.А. Юрмазов, врач отделения общей онкологии¹;
И.В. Кондакова, д.м.н., профессор, зав. лабораторией биохимии опухолей¹;
Е.М. Слонимская, д.м.н., профессор кафедры онкологии³

¹НИИ онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра РАН, 5, пер. Кооперативный, Томск, 634009;

²Сибирский государственный медицинский университет, 2, ул. Московский тракт, Томск, 634050;

³Санкт-Петербургский государственный университет, Университетская набережная, 7–9, Санкт-Петербург, 199034

Цель исследования — оценить роль экспрессии компонентов АКТ/mTOR-сигнального пути в молекулярных механизмах развития и прогрессирования рака почки.

Материалы и методы. Предметом исследования служила опухолевая и неизменная ткань 34 больных светлоклеточным раком почки T₁₋₃N₀₋₁M₀₋₁. Уровень мРНК PTEN, АКТ, GSK-3beta, PDK1, c-RAF, mTOR, киназы p70 S6, 4E-BP1 был исследован методом ПЦР в реальном масштабе времени, а содержание изучаемых показателей определялось методом вестерн блоттинга.

Результаты. Установлено, что уровень мРНК АКТ, фосфатазы PTEN и содержание соответствующих белков связаны с развитием гематогенного метастазирования. Увеличение содержания киназы АКТ при росте ее экспрессии сочетается со снижением уровня белка и количества мРНК фосфатазы PTEN. Показано, что особенности трансляции мРНК в опухолевой ткани также могут определять развитие заболевания. При проведении корреляционного анализа отмечено отсутствие прямых связей между уровнем экспрессии изучаемых компонентов и их белковых продуктов.

Заключение. Молекулярные механизмы опухолевой прогрессии при раке почки связаны с особенностями экспрессии компонентов и содержанием их белков. Уровни мРНК АКТ, PTEN, 4E-BP1 и GSK-3beta ассоциированы с развитием метастатического процесса при раке почки.

Ключевые слова: рак почки; АКТ/mTOR-сигнальный путь; экспрессия mTOR; фосфатаза PTEN; АКТ; GSK-3beta; PDK1; c-RAF; киназа p70 S6; 4E-BP1.

Как цитировать: Spirina L.V., Usynin E.A., Yurmazov Z.A., Kondakova I.V., Slonimskaya E.M. Assessment of АКТ/mTOR signaling pathway components in kidney cancers and their connection with metastases. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2019; 11(4): 74–81, <https://doi.org/10.17691/stm2019.11.4.08>

English

Assessment of АКТ/mTOR Signaling Pathway Components in Kidney Cancers and Their Connection with Metastases

L.V. Spirina, MD, DSc, Associate Professor, Leading Researcher, Laboratory of Tumor Biochemistry¹; Professor, Department of Biochemistry and Molecular Biology with a Course of Clinical Laboratory Diagnostics²;
E.A. Usynin, MD, PhD, Senior Researcher, Department of General Oncology¹; Associate Professor, Department of Oncology²;
Z.A. Yurmazov, Physician, Department of General Oncology¹;
I.V. Kondakova, MD, DSc, Professor, Head of the Laboratory of Tumor Biochemistry¹;
E.M. Slonimskaya, MD, DSc, Professor, Department of Oncology³

Для контактов: Спирина Людмила Викторовна, e-mail: spirinalv@oncology.tomsk.ru

¹Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences,

5 Kooperativny St., Tomsk, 634009, Russia;

²Siberian State Medical University, 2 Moskovsky trakt, Tomsk, 634050, Russia;

³Saint Petersburg State University, 7–9 Universitetskaya naberezhnaya, Saint Petersburg, 199034, Russia

The aim of the study was to assess gene expression of the AKT/mTOR signaling pathway components in the molecular mechanisms of kidney cancer development and progression.

Material and Methods. The subject of the study was a tumor and non-transformed tissue of 34 patients with clear cell kidney cancer T₁₋₃N₀₋₁M₀₋₁. The mRNA level of PTEN, AKT, GSK-3beta, PDK1, c-RAF, mTOR, p70 S6 kinase, 4E-BP1 was studied by real-time PCR, the content of the parameters studied was determined by Western blotting.

Results. The AKT, PTEN mRNA levels, and the protein content were associated with the development of hematogenous metastasis. The increase of AKT content and expression is associated with the decrease in mRNA and protein level of PTEN phosphatase. The specificity of mRNA translation in the tumor tissue has been shown to determine the development of the disease as well. The correlation analysis did not find direct relationship between the level of expression of the studied genes and their protein products.

Conclusion. Molecular mechanisms of tumor progression are associated with gene expression and protein content. The change in AKT, PTEN, 4E-BP1, and GSK-3beta mRNA levels has been found to lead to the development of a metastatic process in kidney cancer.

Key words: kidney cancer; AKT/mTOR signaling pathway; mTOR; PTEN phosphatase; AKT; GSK-3beta; PDK1; c-RAF; p70 S6 kinase; 4E-BP1.

Введение

Фосфатидилинозитол-3-киназный AKT/mTOR-сигнальный путь (PI3K/AKT/mTOR) активируется под влиянием многих ростовых факторов и осуществляет регуляцию процессов деления клетки и ее апоптоза. Его составляющие участвуют в молекулярных механизмах развития и прогрессирования рака почки и являются мишенями для таргетной терапии заболевания [1, 2]. Они представлены фосфоинозитид-3-киназой (PI3K), киназами AKT и mTOR, однако, учитывая значимость последних, каскад часто называют AKT/mTOR. Активация протеинкиназы AKT происходит при действии PDK1 (pyruvate dehydrogenase kinase) и ферментативного комплекса mTORC2, в который входят, помимо mTOR, также mLST8 (mammalian lethal with Sec13 protein 8), известный как GβL (G-protein β-subunit-like protein); rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR); mSin1 (mammalian stress-activated protein kinase (SAPK)-interacting protein 1); protor (protein observed with rictor) [3].

Субстратами киназы AKT являются множество белков, участвующих в процессах роста, пролиферации клеток и апоптозе. В качестве ключевых рассматриваются c-RAF (serine/threonine-protein kinase) и фермент обмена гликогена GSK-3beta (glycogen synthase kinase-3beta) [4, 5]. AKT также играет существенную роль в активации рапамицин-чувствительного комплекса mTORC1, состоящего из mTOR, raptor (regulatory-associated protein of TOR), mLST8 и PRAS40 (proline-rich PKB/AKT substrate 40 kDa) [6].

Протеинкиназа mTOR, как было описано выше, существует в клетке в качестве субъединицы внутриклеточных мультимолекулярных сигнальных комплексов mTORC1 и mTORC2 [7]. Важнейшими субстратами mTOR в комплексе mTORC1 являются киназа p70 S6 (киназа рибосомального белка S6) и 4E-BP1 (иницирующий фактор 4E связывающий протеин 1) [8–10],

которые служат ключевыми регуляторами трансляции мРНК и стимулируют биосинтез белков.

Активность AKT-сигнального пути находится под контролем фосфатазы PTEN [11]. 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 Ser473 в молекуле AKT. Повышение активности этого фермента приводит к активации апоптоза и замедлению пролиферации клеток опухолей, что позволяет отнести его к значимым белкам-онкосупрессорам [12]. Известно, что транскрипционный фактор HIF-1 также может стимулировать активность протеинкиназы mTOR [5].

Активация данного сигнального пути показана при различных видах опухолевых заболеваний [13]. Однако в отношении опухолей почек данные весьма противоречивы. Так, по мнению D.A. Almatore и соавт. [14], только в 40% опухолевых клеток при раке почки является активация AKT/mTOR-сигнального каскада. Известны факты, свидетельствующие о том, что в ткани светлоклеточной опухоли почки наблюдается выраженная гиперэкспрессия AKT-сигнального пути с увеличением содержания его компонентов [15–17]. В ткани рака почки они могут иметь различные значения в зависимости от размера первичной опухоли и наличия гематогенных метастазов заболевания [18, 19]. При этом уровень экспрессии изучаемых метаболитов и их связь с содержанием белковых компонентов в ткани светлоклеточного рака почки практически не изучались.

Большинство исследователей придерживаются той точки зрения, что в онкогенезе большее значение имеет соотношение уровня экспрессии компонентов и содержания соответствующих белков, что определяет биологические особенности опухолевого роста и

прогноза заболевания [20]. В связи с этим **целью настоящего исследования** явилось изучение экспрессии компонентов АКТ-сигнального пути, субстратов mTOR и содержания их белковых продуктов в ткани рака почки в зависимости от распространенности опухолевого процесса.

Материалы и методы

В исследование включено 34 больных светлоклеточным раком почки T₁₋₃N₀₋₁M₀₋₁ (средний возраст — 57,6±2,2 года). В зависимости от размера первичной опухоли пациенты распределились следующим образом: у 10 больных новообразование соответствовало T₁, у 14 — T₂ и у 10 — T₃. Локализованная форма заболевания (T₁₋₃N₀M₀) выявлена у 24 пациентов, диссеминированная — у 10. Объемы диагностики и лечения больных раком почки соответствовали рекомендуемым алгоритмам по диагностике и лечению злокачественных новообразований, утвержденным Министерством здравоохранения РФ.

Проведение данной работы одобрено Этическим комитетом НИИ онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра РАН. Все процедуры с вовлечением больных были выполнены в соответствии с протоколом Хельсинкской декларации по правам человека (2013). Все больные подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Материалом для изучения являлись образцы опухолевой и гистологически не измененной ткани, находящиеся на расстоянии не менее 1 см от границы опухоли.

Таблица 1

Последовательность праймеров проб исследованных компонентов

Компоненты	Ампликон, п.н.	Последовательность
4E-BP1 NM_004095.3	244	F 5'-CAGCCCTTTCTCCCTCACT-3' R 5'-TTCCCAAGCACATCAACCT-3'
AKT1 NM_001014431.1	181	F 5'-CGAGGACGCCAAGGAGA-3' R 5'-GTCATCTTGGTCAGGTGGTGT-3'
c-RAF NM_002880.3	152	F 5'-TGGTGTGTCCTGCTCCCT-3' R 5'-ACTGCCTGCTACCTTACTTCCCT-3'
GSK-3beta NM_001146156.1	267	F 5'-AGACAAGGACGGCAGCAA-3' R 5'-TGGAGTAGAAGAAATAACGCAAT-3'
70S kinase alpha NM_001272042.1	244	F 5'-CAGCACAGCAAATCCTCAGA-3' R 5'-ACACATCTCCCTCTCCACCTT-3'
mTOR NM_004958.3	160	F 5'-CCAAAGGCAACAAGCGAT-3' R 5'-TTCACCAAACCGTCTCCAA-3'
PDK1 NM_001278549.1	187	F 5'-TCACCAGGACAGCCAATACA-3' R 5'-CTCCTCGGTCACTCATCTTCA-3'
GAPDH NM_001256799.2	138	F 5'-GGAAGTCAGGTGGAGCGA-3' R 5'-GCAACAATATCCACTTTACCAGA-3'

Примечание: NM — номер последовательности РНК в NCBI Nucleotide Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>); F — прямой праймер; R — обратный праймер.

Для проведения вестерн блоттинга после забора образцы тканей замораживали и хранили при -80°C. Для выделения мРНК и определения уровня относительной экспрессии образцы тканей помещали в раствор RNeasy Lysis Buffer (Qiagen, США) и после 24-часовой инкубации при +4°C сохраняли при температуре -80°C.

Определение уровня экспрессии компонентов АКТ/mTOR-сигнального пути

Выделение РНК. РНК выделяли с помощью набора RNeasy Mini Kit, содержащего ДНК-азу I (Qiagen, Германия). Для определения количества выделенной РНК на спектрофотометре NanoDrop-2000 (Thermo Scientific, США) оценивали ее концентрацию и чистоту выделения. Концентрация РНК составила от 80 до 250 нг/мкл. Оценку чистоты выделенной РНК осуществляли путем подсчета отношения поглощения на длинах волн 260, 280 и 230 нм. Отношение A260/A280 составляло от 1,95 до 2,05; отношение A260/A230 — от 1,90 до 2,31. Целостность РНК оценивали при помощи капиллярного электрофореза на приборе TapeStation (Agilent Technologies, США) и набора R6K ScreenTape (Agilent Technologies). RIN (RNA integrity number) — показатель, разработанный для выявления ошибок в оценке качества РНК, составил 5,6–7,8.

Количественная ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени. Уровень экспрессии компонента оценивали при помощи количественной обратной-транскриптазной ПЦР RT-qPCR в режиме реального времени с использованием красителя SYBR Green на амплификаторе iCycler (Bio-Rad Laboratories, США). Для получения кДНК на матрице РНК проводили реакцию обратной транскрипции с помощью набора Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) со случайными гексануклеотидными праймерами в соответствии с инструкцией к набору. ПЦР ставили в трех репликах в объеме 25 мкл, содержащем 12,5 мкл Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific), 300 нмоль прямого и обратного праймеров и 50 нг кДНК.

Двухшаговая программа амплификации включала: 1 цикл — 94°C, 10 мин — предварительная денатурация; 40 циклов: 1-й шаг — 94°C, 10 с и 2-й шаг — 20 с — при температуре 60°C. Праймеры были подобраны с использованием программы Vector NTI Advance 11.5 и базы данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) (табл. 1).

В качестве референсного гена использовали ген «домашнего хозяйства» фермента GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) и уровень экспрессии каждого целевого гена нормализовали по отношению к экспрессии GAPDH.

Определение содержания компонентов АКТ/mTOR-сигнального пути

Получение гомогенатов. Заморо-

женную 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 хлорида магния, 1 мМ дитиотреитола, 1 мМ ЭДТА и 100 мМ хлорида натрия. Гомогенат центрифугировали 60 мин при 10 000 g 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-AKT (T308), phospho-GSK-3beta (Ser9), phospho-PDK1 (Ser241), phospho-c-RAF (Ser259), m-TOR, phospho-mTOR (Ser2448), phospho-p70 S6 киназе (Ser371), phospho-4E-BP1 (Thr37/46) (Cell Signaling, США). Затем мембрану подвергали обработке системой хемилюминесцентной детекции ECL (GE Healthcare, Великобритания). Плотность полос оценивали с помощью компьютерной программы ImageJ. Стандартизацию проводили относительно β-актина. Результаты выражали в процентах от содержания показателей в неизменной ткани.

Статистика. Статистическую обработку результатов выполняли с применением пакета программ Statistica 8.0. Достоверность различий между группами определяли с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни для независимых выборок, результаты представлены как M (медиана) с интерквартильным размахом (25-й и 75-й процентиля). Результаты экспрессии генов представлены как средняя ± ошибка средней (M±m). Различия считались статистически значимыми при p<0,05. Непараметрический медианный тест и тест ANOVA Краскела–Уоллиса были использованы для сравнения двух и более независимых выборок. 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

Проведенное исследование показало отсутствие значимых различий в экспрессии компонентов PTEN, АКТ, GSK-3beta, PDK1, c-RAF в зависимости от размера первичной опухоли у больных раком почки (табл. 2). Подобное явление зафиксировано и для уровня мРНК протеинкиназы mTOR. При этом выявлен факт усиления экспрессии киназы 70 S6 в 4,2 раза у больных с размером опухоли, соответствующей T₂N₀M₀, по сравнению с опухолью T₁N₀M₀, и выраженное увеличение уровня мРНК ингибитора транскрипции 4E-BP1 в 8,3 раза у пациентов с размером опухоли T₃N₀M₀₋₁ по сравнению с опухолью T₁N₀M₀. Однако проведение медианного теста и теста ANOVA Краскела–Уоллиса не подтвердило статистической значимости этих различий.

При изучении экспрессии данных показателей у больных с наличием и отсутствием признаков гематогенного метастазирования выявлено нарастание уровня мРНК киназы АКТ и отвечающей за ее фосфорилирование протеинкиназы PDK1 в 7,4 и 1,87 раза соответственно. Также отмечено снижение экспрессии гена, регулирующего синтез гликогена GSK-3beta, в 2,2 раза в ткани опухоли при метастатическом раке почки по сравнению с локализованной формой заболевания (табл. 3). Описанные выше изменения сопровождались

Таблица 2

Относительная экспрессия компонентов АКТ/mTOR-сигнального пути у больных раком почки в зависимости от размера первичной опухоли, усл. ед. (M±m)

Компоненты	Стадия заболевания		
	T ₁ N ₀ M ₀ (n=10)	T ₂ N ₀ M ₀₋₁ (n=14)	T ₃ N ₀ M ₀₋₁ (n=10)
Компоненты АКТ/mTOR-сигнального пути			
PTEN	13,4±7,5	2,4±1,1	41,1±15,0
AKT	20,1±12,5	7,2±4,4	2,5±0,8
GSK-3beta	40,7±17,0	54,7±32,5	9,5±0,9
PDK1	18,5±5,1	25,3±9,7	13,0±3,5
c-RAF	29,9±16,4	2,4±0,9	13,1±3,5
Протеинкиназа mTOR и ее субстраты			
mTOR	49,1±26,0	9,0±3,4	5,6±2,8
Киназа p70 S6	8,3±2,7	35,1±14,4*	2,4±0,9
4E-BP1	7,5±4,1	10,0±4,8	62,1±26,6**

* — статистически значимые различия значений по сравнению с группой больных со стадией T₁N₀M₀ (p<0,05);

** — по сравнению с группой больных со стадией T₂N₀M₀₋₁ (p<0,05).

Таблица 3

Относительная экспрессия компонентов АКТ/mTOR-сигнального пути у больных с локализованным и диссеминированным раком почки, усл. ед. (M±m)

Компоненты	Локализованный рак почки (n=24)	Диссеминированный рак почки (n=10)
Компоненты АКТ/mTOR-сигнального пути		
PTEN	22,45±9,40	8,34±6,70*
AKT	9,84±4,76	72,97±40,12*
GSK-3beta	27,65±9,71	12,4±3,8*
PDK1	16,13±3,19	30,2±17,3*
c-RAF	24,01±8,33	41,13±10,83
Протеинкиназа mTOR и ее субстраты		
mTOR	20,68±9,91	54,83±23,09
Киназа p70 S6	31,98±12,82	32,60±17,22
4E-BP1	12,15±5,40	33,32±11,05*

* — статистически значимые различия значений по сравнению с локализованным раком почки (p<0,05).

Таблица 4

Содержание АКТ/мTOR-сигнального пути у больных раком почки в зависимости от размера первичной опухоли, % (Ме [Q1; Q3])

Компоненты	Стадия заболевания		
	T ₁ N ₀ M ₀ (n=10)	T ₂ N ₀ M ₀₋₁ (n=14)	T ₃ N ₀ M ₀₋₁ (n=10)
<i>Компоненты АКТ/м-TOR сигнального пути</i>			
Phospho-PTEN	104,8 [67,9; 165,3]	110,3 [67,4; 194,4]	83,3 [55,3; 105,0]
АКТ (pan)	170,0 [98,6; 142,9]	168,4 [113,7; 224,1]	284,5 [79,6; 447,8]
Phospho-АКТ (Т308)	125,3 [73,2; 150,4]	134,1 [83,1; 210,9]	127,8 [101,0; 114,0]
Phospho-АКТ (S473)	120,3 [73,2; 150,4]	139,1 [93,1; 200,9]	137,8 [106,0; 124,0]
Phospho-GSK-3beta	186,8 [116,7; 267,5]	151,5 [100,1; 227,0]	107,5 [78,5; 107,3]
Phospho-PDK1	177,7 [116,7; 167,6]	150,9 [54,2; 170,2]	95,6 [76,0; 119,2]
Phospho-c-RAF	126,3 [78,0; 162,0]	164,0 [18,1; 234,5]	286,9 [247,0; 311,1]*
<i>Протеинкиназа mTOR и ее субстраты</i>			
mTOR	179,9 [68,8; 193,0]	211,0 [154,5; 260,4]	124,2 [50,7; 194,1]
Phospho-mTOR (Ser2448)	257,1 [106,4; 318,9]	123,0 [50,0; 164,7]	108,8 [72,6; 181,7]*
Phospho-p70 S6 киназа	106,8 [66,7; 95,0]	101,1 [67,5; 117,7]	102,6 [31,2; 195,5]
Phospho-4E-BP1	107,1 [63,1; 136,6]	141,1 [71,8; 151,8]	266,7 [105,5; 489,9]

* — статистически значимые различия значений по сравнению с группой больных T₁N₀M₀, p<0,05.

Таблица 5

Содержание АКТ/мTOR-сигнального пути у больных с локализованным и диссеминированным раком почки, % (Ме [Q1; Q3])

Компоненты	Локализованный рак почки (n=24)	Диссеминированный рак почки (n=10)
<i>Компоненты АКТ/мTOR-сигнального пути</i>		
Phospho-PTEN	99,7 [70,4; 139,2]	55,3 [55,2; 57,0]*
АКТ (pan)	139,9 [110,7; 229,4]	160,4 [112,3; 175,4]
Phospho-АКТ (Т308)	105,1 [76,1; 156,6]	73,1 [55,9; 84,7]*
Phospho-АКТ (S473)	118,6 [93,2; 164,1]	85,2 [53,4; 106,7]*
Phospho-GSK-3beta	156,1 [106,8; 250,5]	147,5 [97,4; 196,9]
Phospho-PDK1	132,0 [102,4; 168,0]	119,2 [111,7; 132,6]
Phospho-c-RAF	157,1 [102,9; 240,8]	146,4 [75,8; 164,9]
<i>Протеинкиназа mTOR и ее субстраты</i>		
mTOR	158,6 [90,4; 218,0]	129,4 [78,8; 138,4]
Phospho-mTOR (Ser2448)	128,1 [93,0; 205,6]	108,1 [81,7; 160,4]
Phospho-p70 S6 киназа	93,6 [67,1; 117,8]	101,9 [39,0; 173,7]
Phospho-4E-BP1	131,0 [78,1; 188,7]	128,0 [105,4; 136,8]

* — статистически значимые различия значений по сравнению с локализованным раком почки.

уменьшением экспрессии PTEN: уровень мРНК фосфатазы был значимо ниже у больных при наличии отдаленных метастазов заболевания по сравнению с

аналогичным показателем при локализованном процессе.

Известен факт, что активация АКТ/мTOR-сигнального пути в опухоли почки, связанного с дефектом гена фон Гиппеля–Линдау, сопровождается снижением активности киназы GSK-3beta на фоне уменьшения количества убиквитин-лигазы E3 (белок фон Гиппеля–Линдау) [21]. Также имеются данные о том, что уровень экспрессии этого показателя связан с безрецидивной выживаемостью больных раком молочной железы [22, 23]. В связи с этим становится понятным, что именно сниженный уровень экспрессии мРНК киназы GSK-3beta при развитии метастатической формы заболевания сопряжен с прогрессированием рака почки.

Следует особо отметить тот факт, что показатель экспрессии 4E-BP1 также был ассоциирован с развитием гематогенных метастазов. Его экспрессия оказалась

увеличенной в 2,7 раза у больных с диссеминированным раком почки по сравнению с локализованной формой заболевания (см. табл. 3). По всей вероятности, этот показатель является наиболее информативным в отношении предсказания неблагоприятного исхода заболевания как вследствие увеличения размеров первичной опухоли, так и за счет ее диссеминации. Другими словами, экспрессия фактора 4E-BP1 может являться показателем, сопряженным с агрессивным ростом опухоли, что подтверждено и в литературе [8, 24].

При анализе содержания компонентов АКТ/мTOR-сигнального пути у больных раком почки отмечено, что по мере увеличения размеров опухоли наблюдается повышение уровня экспрессии c-RAF и снижение — phospho-mTOR (табл. 4). Развитие отдаленного метастазирования сопровождалось значимым снижением содержания фосфатазы PTEN, phospho-АКТ (Т308) и phospho-АКТ (S473) в опухолевой ткани (табл. 5).

Обращает на себя внимание динамика изменения уровня экспрессии АКТ и его белкового продукта, которые были получены при проведении исследования. На рис. 1 представлены данные, характеризующие экспрессию и содержание протеинкиназ АКТ — phospho-АКТ (Т308) и phospho-АКТ (S473) — у больных с локализованным и диссеминированным раком почки. Выявлено, что экспрессия АКТ нарастала по мере прогрессирования заболевания у больных с наличием гематогенных метастазов, а содержание протеинкиназы при этом снижалось. Эти изменения сопровождалось повышением экспрессии протеинкиназы

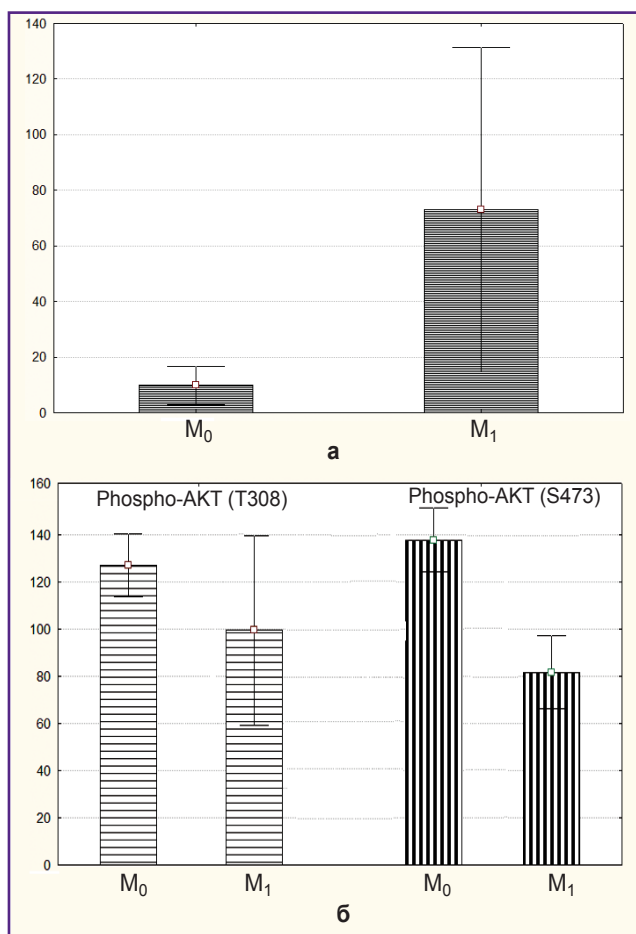


Рис. 1. Экспрессия и содержание протеинкиназы АКТ в ткани опухоли почки:

M₀ — у больных с локализованным раком почки; M₁ — с диссеминированным раком почки: а — экспрессия АКТ, результаты выражены в условных единицах (ось ординат); б — содержание phospho-AKT (T308) и phospho-AKT (S473), результаты выражены в процентах от содержания показателей в неизменной ткани (ось ординат)

PDK1, участвующей в активации исследуемой протеинкиназы АКТ. Можно полагать, что уровень мРНК PDK1 при развитии метастазов заболевания является дополнительным доказательством роли АКТ/mTOR-сигнального пути в прогрессировании рака почки.

На рис. 2 показаны изменения фосфатазы PTEN на уровнях мРНК и соответствующего белка, где снижение экспрессии компонента сопровождалось уменьшением содержания фосфатазы. Прогрессирование рака почки, как известно, связано с функциональной неполноценностью PTEN, что приводит к более выраженной активации АКТ/mTOR-сигнального пути [2, 6]. Доказательством этому служит полученный и подтвержденный нами факт роста экспрессии протеинкиназы АКТ по мере развития диссеминированного процесса. При этом зафиксировано снижение содержания активированных форм АКТ — phospho-AKT (T308) и phospho-AKT (S473), которое позволяет предположить, что высокая активность данного сигнального каскада в условиях неполноценности фосфатазы PTEN осуществляется за счет небольшого количества фермента и приводит к снижению его фосфорилированных форм.

Выявленные разнонаправленные изменения экспрессии киназы АКТ и ее белковых продуктов согласуются с нашими ранее полученными данными относительно транскрипционных и ростовых факторов (HIF-1, HIF-2, VEGF, CAIX) [15, 18], которые также подтверждены и другими авторами [25]. Интересно отметить, что только для белка-онкосупрессора PTEN динамика изменений была сходной как на уровне мРНК, так и на уровне белка, однако это не было подтверждено статистически при проведении корреляционного анализа. В основе таких несоответствий могут лежать изменения процессов синтеза и деградации мРНК, нарушение процессов трансляции, а также активация процессов посттрансляционной модификации белков [26].

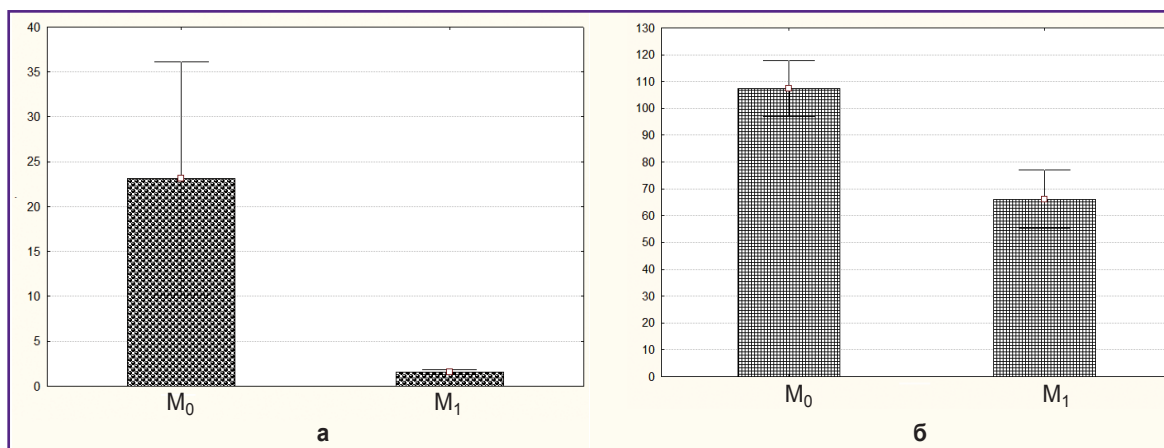


Рис. 2. Экспрессия и содержание фосфатазы PTEN в ткани опухоли почки:

M₀ — у больных с локализованным раком; M₁ — у больных с диссеминированным раком; а — экспрессия PTEN, результаты выражены в условных единицах (ось ординат); б — содержание PTEN, результаты выражены в процентах от содержания показателей в неизменной ткани (ось ординат)

Заключение

Проведенное исследование выявило наличие сопряженности между экспрессией компонентов АКТ/ mTOR-сигнального пути, содержанием их белковых продуктов и развитием прогрессирования заболевания. Изменение уровня мРНК и содержания соответствующего белкового продукта показано для АКТ, фосфатазы PTEN, 4E-BP1 и GSK-3 β . Полученные нами данные свидетельствуют, что при раке почки необходим комплексный подход к его изучению: как на уровне мРНК, так и при анализе содержания соответствующих белковых продуктов. Результаты проведенного исследования расширяют представления об особенностях онкогенеза при раке почки, а также служат фундаментальной основой для определения риска, сопряженного с развитием генерализации опухолевого процесса.

Финансирование исследования. Работа выполнена по заданию НИИ онкологии Томского научного медицинского центра Российской академии наук.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература/References

1. Spirina L.V., Usynin E.A., Kondakova I.V., Yurmazov Z.A., Slonimskaya E.M. Effect of target therapy on the content of transcription and growth factors, protein kinase TOR, and activity of intracellular proteases in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Bull Exp Biol Med* 2016; 160(6): 798–801, <https://doi.org/10.1007/s10517-016-3313-6>.
2. 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; 18(2): 277–283, <https://doi.org/10.1007/s12253-011-9439-y>.
3. Hudson C.C., Liu M., Chiang G.G., Otterness D.M., Loomis D.C., Kaper F., Giaccia A.J., Abraham R.T. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Mol Cell Biol* 2002; 22(20): 7004–7014, <https://doi.org/10.1128/mcb.22.20.7004-7014.2002>.
4. Pópulo H., Lopes J.M., Soares P. The mTOR signalling pathway in human cancer. *Int J Mol Sci* 2012; 13(2): 1886–1918, <https://doi.org/10.3390/ijms13021886>.
5. Li J., Lu Y., Akbani R., Ju Z., Roebuck P.L., Liu W., Yang J.Y., Broom B.M., Verhaak R.G., Kane D.W., Wakefield C., Weinstein J.N., Mills G.B., Liang H. TCGA: a resource for cancer functional proteomics data. *Nat Methods* 2013; 10(11): 1046–1047, <https://doi.org/10.1038/nmeth.2650>.
6. Gao T., Furnari F., Newton A.C. PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol Cell* 2005; 18(1): 13–24, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.03.008>.
7. 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; 32(1): 15–21, <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2013.07.014>.
8. Dodd K.M., Yang J., Shen M.H., Sampson J.R., Tee A.R. mTORC1 drives HIF-1 α and VEGF-A signalling via multiple mechanisms involving 4E-BP1, S6K1 and STAT3. *Oncogene* 2015; 34(17): 2239–2250, <https://doi.org/10.1038/onc.2014.164>.
9. Figlin R.A., Kaufmann I., Brechbiel J. Targeting PI3K and mTORC2 in metastatic renal cell carcinoma: new strategies for overcoming resistance to VEGFR and mTORC1 inhibitors. *Int J Cancer* 2013; 133(4): 788–796, <https://doi.org/10.1002/ijc.28023>.
10. Oeckinghaus A., Postler T.S., Rao P., Schmitt H., Schmitt V., Grinberg-Bleyer Y., Kühn L.I., Gruber C.W., Lienhard G.E., Ghosh S. κ B-Ras proteins regulate both NF- κ B-dependent inflammation and Ral-dependent proliferation. *Cell Rep* 2014; 8(6): 1793–1807, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.08.015>.
11. Thangavelu K., Pan C.Q., Karlberg T., Balaji G., Uttamchandani M., Suresh V., Schüler H., Low B.C., Sivaraman J. 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 U S A* 2012; 109(20): 7705–7710, <https://doi.org/10.1073/pnas.1116573109>.
12. Gerlinger M., Rowan A.J., Horswell S., Math M., Larkin J., Endesfelder D., Gronroos E., Martinez P., Matthews N., Stewart A., Tarpey P., Varela I., Phillimore B., Begum S., McDonald N.Q., Butler A., Jones D., Raine K., Latimer C., Santos C.R., Nohadani M., Eklund A.C., Spencer-Dene B., Clark G., Pickering L., Stamp G., Gore M., Szallasi Z., Downward J., Futreal P.A., Swanton C. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 2012; 366(10): 883–892, <https://doi.org/10.1056/nejmoa1113205>.
13. Quintayo M.A., Munro A.F., Thomas J., Kunkler I.H., Jack W., Kerr G.R., Dixon J.M., Chetty U., Bartlett J.M. GSK3 β and cyclin D1 expression predicts outcome in early breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 136(1): 161–168, <https://doi.org/10.1007/s10549-012-2229-8>.
14. Almatore D.A., Tesla J.R. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene* 2005; 24(50): 7455–7464, <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209085>.
15. Спирина Л.В., Усынин Е.А., Кондакова И.В., Юрмазов З.А., Слонимская Е.М., Колегова Е.С. Активация АКТ сигнального пути и уровень субстратов m-TOR в опухоли больных раком почки, связь с распространенностью злокачественного процесса. *Вопросы онкологии* 2016; 62(3): 490–494. Spirina L.V., Usynin E.A., Kondakova I.V., Yurmazov Z.A., Slonimskaya E.M., Kolegova E.S. Activation of AKT of signaling pathway and the level of mTOR substrates in tumor of patients with kidney cancer, connection with prevalence of malignancy. *Voprosy onkologii* 2016; 62(3): 490–494.
16. Darwish O.M., Kapur P., Youssef R.F., Bagrodia A., Belsante M., Alhalabi F., Sagalowsky A.I., Lotan Y., Margulis V. 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; 81(3): 581–586, <https://doi.org/10.1016/j.urology.2012.11.030>.
17. Lidgren A., Bergh A., Grankvist K., Lindh G., Ljungberg B. Hypoxia-inducible factor-1 α mRNA and protein levels in renal cell carcinoma. *J Cancer Mol* 2008; 4(5): 153–157.
18. Юрмазов З.А., Усынин Е.А., Кондакова И.В., Слонимская Е.М., Спирина Л.В. Связь молекулярных пара-

метров опухоли с эффективностью лечения пазопанибом у больных диссеминированным раком почки. Молекулярная медицина 2015; 6: 61–66. Yurmazov Z.A., Usynin E.A., Kondakova I.V., Slonimskaya E.M., Spirina L.V. Association of cancer molecular parameters with effectiveness of pazopanib treatment in advanced kidney cancer patients. *Molekulyarnaya meditsina* 2015; 6: 61–66.

19. Akbani R., Ng P.K., Werner H.M., Shahmoradgoli M., Zhang F., Ju Z., Liu W., Yang J.Y., Yoshihara K., Li J., Ling S., Seviour E.G., Ram P.T., Minna J.D., Diao L., Tong P., Heymach J.V., Hill S.M., Dondelinger F., Städler N., Byers L.A., Meric-Bernstam F., Weinstein J.N., Broom B.M., Verhaak R.G., Liang H., Mukherjee S., Lu Y., Mills G.B. A pan-cancer proteomic perspective on The Cancer Genome Atlas. *Nat Commun* 2014; 5: 3887, <https://doi.org/10.1038/ncomms4887>.

20. Lolkema M.P., Mans D.A., Ulfman L.H., Volpi S., Voest E.E., Giles R.H. Allele-specific regulation of primary cilia function by the von Hippel-Lindau tumor suppressor. *Eur J Hum Genet* 2008; 16(1): 73–78, <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201930>.

21. Mendoza M.C., Er E.E., Blenis J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem Sci* 2011; 36(6): 320–328, <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.03.006>.

22. Schultz L., Chauv A., Albadine R., Hicks J., Kim J.J.,

De Marzo A.M., Allaf M.E., Carducci M.A., Rodriguez R., Hammers H.J., Argani P., Reuter V.E., Netto G.J. 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): 1549–1556, <https://doi.org/10.1097/pas.0b013e31822895e5>.

23. Yu S., Hou Q., Sun H., Liu J., Li J. Upregulation of C-C chemokine receptor type 7 expression by membrane-associated prostaglandin E synthase-1/prostaglandin E2 requires glycogen synthase kinase 3 β -mediated signal transduction in colon cancer cells. *Mol Med Rep* 2015; 12(5): 7169–7175, <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4290>.

24. Greenbaum D., Colangelo C., Williams K., Gerstein M. Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome Biol* 2003; 4(9): 117, <https://doi.org/10.1186/gb-2003-4-9-117>.

25. Han G., Zhao W., Song X., Kwok-Shing Ng P., Karam J.A., Jonasch E., Mills G.B., Zhao Z., Ding Z., Jia P. Unique protein expression signatures of survival time in kidney renal clear cell carcinoma through a pan-cancer screening. *BMC Genomics* 2017; 18(Suppl 6): 678, <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4026-6>.

26. Guo H., German P., Bai S., Barnes S., Guo W., Qi X., Lou H., Liang J., Jonasch E., Mills G.B., Ding Z. The PI3K/AKT Pathway and Renal Cell Carcinoma. *J Genet Genomics* 2015; 42(7): 343–353, <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2015.03.003>.