

А.М. Камышный

ВЛИЯНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА НА ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ИММУННОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ ПРОТЕАСОМЫ LMP-2 И ПРОАПОПТОТИЧЕСКОГО БЕЛКА p53 В ТИМУСЕ У КРЫС СО СПОНТАННОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ

Запорізький державний медичний університет

Ключові слова: LMP-2, p53, тимус, SHR.

Ключевые слова: LMP-2, p53, тимус, SHR.

Key words: LMP-2, p53, thymus, SHR.

В експерименті досліджувались та обговорювались особливості експресії білка p53 та імунної субодиниці протеасоми LMP-2 в тимусі щурів SHR. Для визначення p53 та LMP-2 було застосовано методи подвійної імунофлюоресценції з використанням моноклональних антитіл до p53, LMP-2, CD4-антигену і цитокератинів щура. Встановлено, що розвиток ЕЦД у щурів SHR супроводжується зниженням кількості LMP-2+-клітин в мозговій речовині тимуса та концентрації білка LMP-2 в порівнянні з контрольною групою тварин, а також призводить до зменшення кількості p53+-клітин і концентрації білка p53 в тимусі.

В експерименте исследовались и обсуждались особенности экспрессии белка p53 и иммунной субъединицы протеасомы LMP-2 в тимусе у крыс SHR. Для определения p53 и LMP-2 были применены методы двойной иммунофлюоресценции с использованием моноклональных антител к p53, LMP-2, CD4-антигену и цитокератинам крысы. Установлено, что развитие ЭСД у крыс линии SHR сопровождается снижением количества LMP-2+-клеток в мозговом веществе тимуса и концентрации белка LMP-2 в обеих изученных зонах тимуса по сравнению с контрольной группой животных, а также приводит к снижению количества p53+-клеток и концентрации белка p53 в тимусе.

In experiment expression peculiarities of p53 protein and immune proteasomes subunit LMP-2 in SHR rat thymus were researched and discussed. Double immunofluorescence with using monoclonal antibodies to p53, LMP-2, CD4-antigen and rat cytokeratins was applied for p53 and LMP-2 determination. We have established that EDM development of SHR rats is accompanied with LMP-2+-cells decreased in thymus cortical substance and protein LMP-2 concentration in both researching thymus zones compared with control animal group and also with p53-cells decreased and thymus protein p53 concentration.

Апоптоз регулируется двумя основными цитоплазматическими протеолитическими системами: каспазами, относящихся к семейству специфических цитоплазматических цистеиновых протеаз, которые расщепляют белковый субстрат после остатков аспартата, и протеасомами. Причем каспазы составляют, скорее, исключение из правил, так как в основном регулируемый протеолиз в цитоплазме осуществляется 26-S протеасомой, огромным мультикаталитическим комплексом [2]. Интересно, что в протеасомах деградируют специфические белки-регуляторы апоптоза, тогда как, с другой стороны, некоторые компоненты протеасомной системы расщепляются каспазами [3]. Протеасомы осуществляют программируемый протеолиз и процессинг различных групп апоптоз-регулирующих белков, обладающих как про-, так и анти-апоптотическими функциями в клетке, среди которых транскрипционные факторы c-Fos, c-Мус, NF-κB, AP-1, белки семейства p53, Bcl-2 и др [13]. При действии индукторов апоптоза повышается способность протеасом к расщеплению мРНК p53 и ингибируется их РНКазная активность по отношению к мРНК c-fos [15].

Одним из белков-регуляторов апоптоза, подвергающихся протеасомному протеолизу, является проапоптотический белок p53. Данный белок является важнейшим регулятором уровня апоптоза тимоцитов, который способен не только активировать гены, участвующие в индукции клеточной смерти за счет своей транскрипционной функции, но и принимать непосредственное участие в индукции митохондриального пути апоптоза. Показано, что повреждение ДНК способствует накоплению p53, который, в свою очередь, блокирует прогрессию

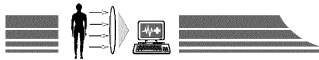
клеточного цикла в фазе G1, препятствуя, таким образом, репликации ДНК до репарации повреждения. Если репарация повреждения невозможна, то белок p53 запускает механизм апоптоза [6].

В свою очередь, важными факторами риска развития сахарного диабета 1 типа (СД 1 типа) являются дефекты позитивной и негативной селекции тимоцитов, осуществляемой путем апоптоза. В наших предыдущих работах было показано, что у крыс со спонтанной гипертензией (SHR) наблюдается более высокий уровень апоптотических лимфоцитов в структуре лимфоидной популяции по сравнению с крысами линии Wistar [1]. В тоже время, причины таких различий неизвестны. Поэтому, **ЦЕЛЮЮ** настоящего **ИССЛЕДОВАНИЯ** было изучить особенности экспрессии иммунной субъединицы протеасомы LMP-2 и белка p53 в тимусе у крыс SHR с экспериментальным сахарным диабетом (ЭСД).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

Исследования проведены на 12 самцах крыс линии SHR массой 250-290 г (возраст 5-6 месяцев). ЭСД моделировали однократным внутрибрюшинным введением стрептозотоцина (SIGMA, США) в дозе 50 мг/кг. Через 3 недели животных с уровнем гликемии больше 8 ммоль/л декапитировали под наркозом и выделяли тимус, который фиксировали в растворе Буэна (18 часов) и после стандартной гистологической обработки заливали в парафин.

Для выявления экспрессии p53 и LMP-2 в тимусе использовали метод двойной иммунофлюоресценции. Для этого гистологические срезы тимуса инкубировали в течении 18 часов во влажной камере при T=40C одновременно с первичными кроличьими моноклональными антителами к p53 или LMP-2 крысы



производства Santa Cruz Biotechnology (США), с мышинными моноклональными антителами к цитокератинам крысы (monoclonal Anti-Pan Cytokeratin - MAPC, клон РСК-26) производства Sigma, (США) и с мышинными моноклональными антителами к CD4-антигену крысы производства Beckman Coulter (США), уже конъюгированными с флюоресцеина изотиоционатом (FITC) в вариантах p53-CD4, LMP-2-MAPC, LMP-2-CD4. После отмывки избытка первичных антител в 0,1 М фосфатном буфере, срезы инкубировали 60 минут ($T=37^{\circ}\text{C}$) со вторичными антителами в разведении 1:64. В качестве вторичных антител использовали козы антитела к полной молекуле IgG кролика, конъюгированные с Texas Red (Santa Cruz Biotechnology, США). Изображение, получаемое на микроскопе AXIOSKOP (ZEISS, Германия) в ультрафиолетовом спектре возбуждения 390 нм (FITC) или 595 нм (Texas Red) с помощью высокочувствительной видеокамеры COHU-4922 (COHU Inc., США) вводилось в компьютерную систему цифрового анализа изображения VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ. Изучение серийных срезов тимуса контрольных крыс линии SHR, предварительно инкубированных с моноклональными антителами к LMP-2, показало, что количество LMP-2+-клеток в корковом веществе тимуса составляло 385 ± 23 на 1 мм^2 , что на 45% ниже, чем в мозговом веществе, и в 2 раза ниже, чем в коре тимуса у крыс линии Wistar. При этом среди LMP-2+-клеток идентифицировались как эпителиоретикулоциты тимуса (LMP-2+MAPC+), так и тимоциты (LMP-2+CD4+), что свидетельствует об активном участии этих клеток в генерации пептидов для негативной селекции. Развитие ЭСД у крыс линии SHR не влияло на количество LMP-2+-клеток в корковом веществе тимуса и сопровождалось снижением их плотности популяции в мозговом веществе тимуса на 26% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем.

Изучение концентрации белка LMP-2 в LMP-2+-клетках тимуса крыс линии SHR показало, что развитие ЭСД сопровождалось уменьшением данного показателя в обеих изученных зонах тимуса по сравнению с контрольной группой животных, наиболее выраженным в коре (на 19%, $p < 0,05$).

Изучение серийных срезов тимуса контрольных крыс линии SHR, предварительно инкубированных с моноклональными антителами к p53, показало, что суммарная плотность p53+-клеток в корковом веществе тимуса составляла 840 ± 47 на 1 мм^2 , что на 51% выше их количества в мозговом веществе и на 18% выше, чем у крыс линии Wistar. Последнее обстоятельство, по-видимому, частично объясняет причину более высокого количества апоптотических лимфоцитов у крыс SHR по сравнению с животными линии Wistar. При этом в структуре популяции p53+-клеток в обеих исследованных зонах тимуса в норме преобладали p53+-лимфобласты и p53+-большие лимфоциты, на долю которых суммарно приходилось около 70% иммунопозитивных клеток.

Развитие ЭСД сопровождалось снижением количества p53+-клеток в корковом веществе тимуса на 45% ($p < 0,05$) и в мозговом веществе на 30% ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой животных. Изучение распределения отдельных классов и структуры популяции p53+-клеток у экспериментальных животных линии SHR в коре тимуса показало, что развитие ЭСД сопровождалось уменьшением количества p53+-больших лимфоцитов (на 53%, $p < 0,05$) и p53+-средних лимфоцитов (на 50%, $p < 0,05$), тогда как в структуре популяции p53+-клеток отмечалось увеличение процентной доли p53+-лимфобластов (на 36%, $p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой животных. При этом в медуллярной зоне тимуса развитие ЭСД приводило к уменьшению количества и процентной доли p53+-больших лимфоцитов при отсутствии изменений в других классах p53+-клеток по сравнению с контрольной группой животных.

Изучение концентрации белка p53 в корковом веществе тимуса у крыс линии SHR показало, что развитие ЭСД приводило к достоверному ее снижению во всех классах p53+-клеток на 21-23% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Аналогичные, но несколько менее выраженные эффекты наблюдались и в мозговом веществе тимуса, где концентрации белка p53 снижались в p53+-клетках на 11-15% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем, за исключением p53+-средних лимфоцитов.

Обсуждая полученные результаты, необходимо отметить, что механизмы участия протеасом в процессе апоптоза достаточны сложны и неоднозначны - исследования с использованием их ингибиторов указывают на тот факт, что во многих типах клеток они индуцируют апоптоз, в то время как в других клетках не оказывают эффекта или, напротив, генерируют сигнал к выживанию клетки [19]. Такое проапоптотическое и антиапоптотическое функционирование протеасом, по-видимому, обусловлено типом клеток и их пролиферативным статусом [16].

Проапоптотическая функция протеасом впервые была показана на примере мышинных тимоцитов и нейронов. Так, тимоциты мыши, после стимуляции апоптоза дексаметазоном выживали при добавлении ингибиторов протеасом в течение 1 часа после воздействия апоптотического стимула [9]. Более позднее добавление (на 3-5 час) ингибиторов протеасом уже было не в состоянии спасти клетки от апоптоза. Подобные данные были получены и при исследованиях с дифференцированными нейронами мозжечка крысы [5]. Кроме того, было обнаружено, что ингибиторы протеасом предотвращают рецептор-опосредованный апоптоз Т-лимфоцитов в Т-клеточной гибридоме, вызванный Fas-лигандом [17]. Деятельность протеасом вовлечена преимущественно в ранние этапы индукции апоптоза, еще до изменений со стороны митохондрий и до активации каспаз [18]. Еще один возможный механизм проапоптотической функции протеасом был продемонстрирован при исследовании человеческих эндотелиальных клеток из пупочной вены (HUVECs) после



индукции их апоптоза с помощью TNF-а [16]. На ранних этапах такого апоптоза отмечается специфическая деградация анти-апоптотического белка Bcl-2 в протеасомах. Однако, при введении ингибиторов протеасом протеолиз Bcl-2 прерывается и клетки в апоптоз не вступают.

В пользу антиапоптотической функции протеасом свидетельствует факт чрезвычайно высокой их экспрессии в быстро пролиферирующих недифференцированных и опухолевых клетках, что, по-видимому, создает предпосылки для их выживания. Эксперименты с применением ингибиторов протеасом подтвердили эту гипотезу [16]. Впервые анти-апоптотическая функция протеасом была обнаружена в 1995 году в исследованиях с применением их ингибитора лактацистина в клетках человеческой лейкемии U937 [11]. После этого, было много других исследований, в которых применялись различные ингибиторы протеасом и подтвердивших, что их применение стимулирует апоптоз быстро пролиферирующих и неопластических клеток гематопоезического, мезенхимального и эпителиального происхождения [7,16]. Причем в некоторых типах опухолевых клеток применение ингибиторов протеасом в состоянии вызвать апоптоз даже в случае резистентности к другим проапоптотическим стимулам. Так, лактацистин и MG132 вызывают апоптоз опухолевых В-лимфоцитов у больных с В-клеточным хроническим лимфолейкозом (В-CLL) во всех стадиях болезни, включая случаи резистентные к обычной химиотерапии [19]. Протеасомный ингибитор MG132 - мощный стимулятор апоптоза для раковых клеток простаты РС3 [20].

Один из механизмов анти-апоптотических эффектов протеасом может заключаться в уменьшении деградации в них ряда регуляторных протеинов, например транскрипционного фактора с анти-апоптотическими эффектами NF-κB [19]. Активный NF-κB транспортируется из цитоплазмы в ядро, где это инициализирует транскрипцию анти-апоптотических белков (A1/Bfl1, IAP и bcl-2) и предотвращает развитие апоптоза. Ингибиторы протеасом уменьшают активность NF-κB за счет стабилизации белка IκBa, и запускают апоптоз в трансформированных клетках или делают их более чувствительными к химиотерапии [16].

Еще один механизм анти-апоптотического действия протеасом может заключаться в усилении протеасомной деградации проапоптотического белка p53. Инициаторами разрушения p53 в системе 26S протеасом служат несколько убиквитиновых лигаз типа E3. Наиболее изученной среди них является убиквитиновая лигаза Mdm2, которая сама является продуктом гена, активируемого p53 [4]. В результате, повышение активности p53 приводит к индукции Mdm2, и, соответственно, к усилению разрушения p53 в 26S протеасомах. Таким образом, за счет белка Mdm2 устанавливается обратная связь, обеспечивающая саморегуляцию активности p53.

Ингибиторы протеасом способны вызвать накопление

онкопротеина с-Мус - важного регулятора клеточного цикла, пролиферации и апоптоза. Нарушение его экспрессии ассоциируют с развитием многих опухолей человека, включая лимфому Беркитта [8]. В норме с-Мус очень быстро разрушается в протеасомах, тогда как после применения их ингибиторов наблюдается активация с-Мус и индукция апоптоза [19].

Наконец, анти-апоптотические эффекты протеасом могут реализовываться через регулирование уровней вторичных мессенджеров, таких как цАМФ и оксид азота, который, в свою очередь, является регулятором апоптоза [14].

В литературе достаточно подробно освещена роль p53 в регуляции апоптоза как за счет его транскрипционной активности, так и при непосредственном участии в индукции митохондриального пути клеточной смерти [6]. После активации p53 он способен поступать в митохондрии из цитоплазмы, минуя входение в ядро. В митохондриях p53 подвергается быстрому ферментативному деубиквитинированию и превращению в активную форму. P53 вступает во взаимодействие с BH4 доменом антиапоптотических белков BclXL и Bcl2 [10]. Связывание с антиапоптотическими белками высвобождает и активирует проапоптотические белки Bax и Bid. Все эти взаимодействия вызывают выброс цитохрома C и индукцию апоптоза даже без транскрипционной активации проапоптотических генов-мишеней p53. Как это не парадоксально, но возможно, что p53 может оказывать при определенных условиях и анти-апоптотические эффекты, многочисленные подтверждения чему были приведены в недавно вышедшем обзоре Janicke R. et al. (2008) с красноречивым названием "The dark side of a tumor suppressor: anti-apoptotic p53" [12].

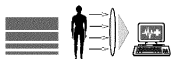
ВЫВОДЫ

1. Развитие ЭСД у крыс линии SHR сопровождается снижением количества LMP-2⁺-клеток в мозговом веществе тимуса и концентрации белка LMP-2 в обеих изученных зонах тимуса по сравнению с контрольной группой животных, что влечет за собой дефект генерации эндогенных пептидов для негативной селекции тимоцитов.

2. Развитие ЭСД у крыс линии SHR приводит к снижению количества p53⁺-клеток и концентрации белка p53 в тимусе. Обнаруженные изменения тимической экспрессии таких важнейших регуляторов апоптоза как белок p53 и иммунная субъединица протеасомы LMP-2 позволяют нам сделать заключение о нарушениях процессов апоптоза тимоцитов при ЭСД, что способно вызвать дисбаланс про- и анти-апоптогенных стимулов и привести к нарушениям процессов их селекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Камышный А. М. Морфофункциональное состояние тимуса у крыс со спонтанной гипертензией // Проблемы, достижения и перспективы развития медико-биологических наук и практического здравоохранения (труды Крымского государственного медицинского университета им. С.И. Георгиевского) - 2006.-Т.142.-№3. -



С. 48-50.

2. Цимоха А., Миттенберг А., Куличкова В., Ватажок Ю., Моисеева Т., Евтеева И., Ермолаева Ю., Гаузе Л., Константинова И. Перепрограммирование ядерных протеасом при индукции апоптоза в клетках K562. I. Воздействие глутатионистощающего агента диэтилмалеата // Цитология.-2007-Том 49-№6-С.451-459

3. Adrain C., Creagh E., Cullen S., Martin S. Caspase-dependent inactivation of proteasome function during programmed cell death in Drosophila and man // J. Biol. Chem.-2004.- Vol. 279.-P. 36923-36930

4. Brooks C., Gu W. p53 ubiquitination: Mdm2 and beyond // Mol. Cell.-2006.- Vol.3.-P.307-315

5. Canu N., Barbato C., Ciotti M., Serafino A., Dus L., Calissano P. Proteasome involvement and accumulation of ubiquitinated proteins in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis // J. Neurosci.-2000.- Vol. 20.-P. 589-599.

6. Chipuk J., Green D. Dissecting p53-dependent apoptosis // Cell Death Differ.-2006.- Vol.13.-P.994-1002.

7. Drexler H., Risau W., Konecny M. Inhibition of proteasome function induces programmed cell death in proliferating endothelial cells // FASEB J.-2000.- Vol. 14.-P. 65-77.

8. Gregory M., Hann S. c-Myc proteolysis by the ubiquitin-proteasome pathway: stabilization of c-Myc in Burkitt's lymphoma cells // Mol. Cell Biol.-2000.- Vol. 20.-P. 2423-2435.

9. Grimm L., Goldberg A., Poirier G., Schwartz L., Osborne B. Proteasomes play an essential role in thymocyte apoptosis // EMBO J.-1996.- Vol. 15.- P. 3835-3844

10. Hemann M., Lowe S. The p53-Bcl-2 connection // Cell Death and Differentiation.-2006.- Vol.13.-P. 1256-1259

11. Imajoh-Ohmi S., Kawaguchi T., Sugiyama S., Tanaka K., Omura S., Kikuchi H. Lactacystin, a specific inhibitor of the proteasome, induces apoptosis in human monoblast U937

cells // Biochem. Biophys. Res. Commun.- 1995.- Vol. 217.-P. 1070-1077.

12. Janicke R., Sohn D., Schulze-Osthoff K. The dark side of a tumor suppressor: anti-apoptotic p53 // Cell Death. Differ.-2008.-Vol. 15.-P. 959-976

13. Konstantinova I., Tsimokha A., Mittenberg A. Role of proteasomes in cellular regulation // Int. Rev. Cell Mol. Biol.-2008.- Vol. 267.-P.59-124

14. Lee M., Hyun D., Marshall K., Ellerby L., Bredesen D., Jenner P., Halliwell B. Effect of overexpression of Bcl-2 on cellular oxidative damage, nitric oxide production, antioxidant defenses, and the proteasome // Free Radic. Biol. Med.- 2001.- Vol. 31.-P. 1550-1559.

15. Mittenberg A., Moiseeva T., Barlev N. Role of proteasomes in transcription and their regulation by covalent modifications // Front. Biosci.-2008.- Vol.13.-P.7184-7192

16. Naujokat C., Hoffmann S. Role and function of the 26S proteasome in proliferation and apoptosis // Lab. Invest.-2002.- Vol. 82.-P. 965-980

17. Tanimoto Y., Kizaki H. Proteasome inhibitors block Ras/ERK signaling pathway resulting in the down regulation of Fas ligand expression during activation-induced cell death in T cells // J. Biochem.-2002.- Vol. 131.-P. 319-326

18. Wallace A., Cidlowski J. Proteasome-mediated glucocorticoid receptor degradation restricts transcriptional signaling by glucocorticoids // J. Biol. Chem.-2001.- Vol. 276.-P. 42714-42721

19. Wojcik C. Regulation of apoptosis by the ubiquitin and proteasome pathway // J. Cell Mol. Med.-2002.- Vol. 6.-P. 25-48

20. Yang W., Monroe J., Zhang Y., George D., Bremer E., Li H. Proteasome inhibition induces both pro- and anti-cell death pathways in prostate cancer cells // Cancer Lett.- 2006.- Vol. 243.-P. 217-227.

Сведения об авторе:

Камышный А.М., к.мед.н., ассистент кафедры патологической физиологии ЗГМУ.

69035, г. Запорожье, пр-т Маяковского 26, ЗГМУ, кафедра патологической физиологии, Тел. раб.: 8 (0612) 34-35-61, 8 (0612) 34-27-22, моб. 8-066-926-63-08