

*М.Ю. Шабельник
Т.А. Тарасова
С.В. Меренцев
С.П. Сидоренко*

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України

ДУ «Національний інститут раку»

Київська міська онкологічна лікарня, Київ, Україна

Ключові слова: аденокарцинома шлунка, протеїнкіназа D, ядерний антиген проліферуючих клітин.

РІВЕНЬ ЕКСПРЕСІЇ ТА ФОСФОРИЛЮВАННЯ PKD1/2 У КЛІТИНАХ АДЕНОКАРЦИНОМ ШЛУНКА РІЗНОГО СТУПЕНЯ ДИФЕРЕНЦІЮВАННЯ

Резюме. Виявлено експресію PKD1- та PKD2-кіназ як в умовно-нормальних та реактивно змінених тканинах шлунка, так і в тканинах шлунка хворих на аденокарциному. Показано, що рівень експресії, аутофосфорилування та внутрішньоклітинна локалізація PKD1/2-кіназ корелює зі ступенем диференціювання аденокарцином. Пухлини з помірним ступенем диференціювання мають високий рівень експресії та аутофосфорилування PKD1/2 у цитоплазмі та ядрі клітин, а низькодиференційовані аденокарциноми при виявленні PKD1/2-кіназ характеризуються низьким рівнем імуногістохімічної реакції у цитоплазмі.

До злоякісної трансформації клітин призводить накопичення незалежних мутацій, які викликають порушення регуляції сигнальних шляхів, що контролюють проліферацію, диференціювання та апоптоз клітин [1].

Пухлини шлунка — велика та різноманітна група новоутворень, яка по поширенню в світі знаходиться на другому місці серед злоякісних новоутворень. Незважаючи на кардинальні хірургічні втручання та ад'ювантну терапію, смертність хворих на рак шлунка (РШ) залишається на високому рівні і складає від 3 до 10% летальних випадків від пухлин усіх локалізацій [2]. 90% всіх пухлин шлунка злоякісні, серед них 95% — аденокарциноми шлунка (АКШ). Після лікування хворих на це захворювання, що полягає в резекції шлунка, субтотальній чи тотальній гастроектомії, лімфаденектомії, 5-річна виживаність складає всього 10–30%. Немає сумніву в тому, що подальше вивчення молекулярно-генетичних особливостей патогенезу РШ буде сприяти пошуку нових підходів для підвищення ефективності лікування хворих.

Родина серин/треонін (Ser/Thr) протеїнкіназ D (PKD) включає три кінази PKD1 (PKC μ), PKD2 та PKD3 (PKC ν) [3]. Активаторами цих кіназ можуть бути форболові ефіри, аналоги діацилгліцеролу [4], нейропептиди [5], бріостатин [6], індуктори оксидативного стресу [7, 8], тромбоцитарний фактор росту (PDGF) [9], фактор некрозу пухлин (TNF α) [10], ССКВ-гастринний рецептор [11], антигени та ін. Протеїнкінази родини PKD характеризуються унікальною модульною структурою і містять регуляторний та каталітичний/кіназний функціональні домени. Регуляторний домен складається із структурних доменів: аполярної частини (PKD1 та PKD2), діацилгліцерол/форбол ефірзв'язуючого домену (CRD-домен), що в свою чергу складається з двох збагачених на цистеїн частин (CYS1 та CYS2), які

з'єднані між собою довгим лінкером; домену, збагаченого на негативно заряджені амінокислоти, та домену гомології плекстрину (PH). Первинна структура Ser/Thr-кіназного каталітичного домену має важливе значення в субстратній специфічності протеїнкіназ родини PKD [12–15].

Активація PKD1, PKD2 та PKD3 відбувається при фосфорилуванні залишків серину, які містяться в різних структурних модулях. Були ідентифіковані ділянки трансфосфорилування: у людини — це Ser738/742, Ser706/710, Ser731/735 для PKD1, PKD2 та PKD3 відповідно, а також сайти аутофосфорилування Ser910 (PKD1) і Ser876 (PKD2). Сайту аутофосфорилування у складі PKD3 немає. Два додаткові сайти фосфорилування ідентифіковано у регуляторному домені PKD1 — Ser197 (сайт аутофосфорилування) та Ser249 [13, 16]. Також у складі PKD1 та PKD2 є сайти фосфорилування по тирозину Tyr95, Tyr432, Tyr463, Tyr562 та Tyr463 і Tyr436 відповідно, фосфорилування яких призводить до стрес-індукованої активації ядерного фактору транскрипції NF- κ B [15, 17]. Запропоновано декілька механізмів активації PKD1- та PKD2-протеїнкіназ. PLC γ -залежна активація PKD потребує продукції діацилгліцеролу і стимуляції класичних протеїнкіназ C [18, 19]. Було виявлено, що активація PKD в апараті Гольджі залежить від G γ β -субодиниць [20–23], також виявлено додаткові механізми активації PKD1: розщеплення каспазами [24] та фосфорилування Tyr463 у PH-домені [12, 13]. Активація PKD1- та PKD2-протеїнкіназ супроводжується цитоплазматичною релокалізацією і транслокацією до поверхневої мембрани [20, 25–27]. У цитоплазмі кінази залучені до везикулярного транспорту від апарату Гольджі до мембрани [5, 15, 17, 28], в ядрі вони приймають участь у епігенетичній регуляції роботи генів шляхом фосфорилування HDAC [29]. Таке фосфорилуван-

ня сприяє зв'язуванню HDAC з білком 14-3-3 та ядерному експорту і призводить до ацетилювання гістонів і активації роботи генів [30], що може впливати на біологічні властивості клітин. Висока структурна гомологія PKD1 та PKD2 обумовлює подібні механізми регуляції активації цих кіназ, але вони відрізняються за внутрішньоклітинною локалізацією, клітинно-специфічною експресією та субстратною специфічністю [31].

Промоторами канцерогенезу шлунково-кишкового тракту у людини можуть бути гастроентеропанкреатичні гормони [32]. Зокрема, гастрин має трофічний вплив, викликає гіперплазію обкладових і головних клітин, проліферацію клітин слизової оболонки шлунка і таким чином може впливати на пухлинний ріст [33, 34]. При створенні експериментальної моделі РШ у щурів за допомогою N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідину введення гастрину призводить до розвитку РШ дифузного типу [35]. Активация PKD2 у лінії клітин АКШ під дією гастрину свідчить про можливу участь цієї кінази у патогенезі захворювання у людини. У той же час залишаються відкритими питання про рівень експресії, функціональну активність та роль PKD1- та PKD2-кіназ у регуляції сигнальних каскадів при розвитку РШ. В епітеліальній клітинній лінії AGS, яка походить з АКШ людини, експресована неактивна/нефосфорильована PKD2 [11], але чи експресована PKD2-кіназа в нормальних та злоякісно трансформованих тканинах шлунка раніше досліджено не було. Крім того, ще мало відомо про експресію та функціональну активність ферментів родини PKD у клітинах різного походження [11]. Нещодавно виявлена епігенетична інактивація експресії PKD1 у клітинних лініях, що походять з РШ, а також у 59% випадків РШ [37], що є клінічним спостереженням хворих, але дослідниками не був проведений аналіз з урахуванням ступеня диференціації пухлин, а також не вивчали активність цієї кінази. Саме тому мета нашої роботи — дослідити рівень експресії та аутофосфорильовання PKD1- та PKD2-кіназ у пухлинних клітинах хворих на АКШ.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єктом досліджень були операційні гістопрепарати видаленої пухлинної тканини 36 хворих на АКШ, тканини шлунка, що використовувалися як умовний контроль (12 випадків) та реактивно змінені тканини шлунка (3 випадки). Хворі віком від 40 до 75 років були прооперовані у Київській міській онкологічній лікарні і не отримували неoad'ювантної протипухлинної терапії. Розподіл досліджуваних гістопрепаратів РШ проводили з урахуванням ступеня диференціації. Відповідно до нього хворі були поділені на 2 групи: хворі з помірно- та з низькодиференційованою АКШ.

Лізати пухлинних тканин виготовлено із попередньо кріоконсервованих у рідкому азоті шматочків пухлин, гомогенізованих механічним

шляхом. Для лізису було використано лізисний буфер (0,05M Tris, 2mM EDTA, 2mM EGTA, 1% Triton X-100 pH 7,4), що містив інгібітори протеаз (апротинін 1 $\mu\text{g}/\text{мл}$, леупептин 1 $\mu\text{g}/\text{мл}$, пепстатин 1 $\mu\text{g}/\text{мл}$, PMSF 2 mM, інгібітор трипсину із соєвих бобів 100 $\mu\text{g}/\text{мл}$, мікроцистін (0,2 $\mu\text{g}/\text{мл}$), інгібітори фосфатаз (Na_3VO_4 100 mM, NaF 50 mM, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 5 mM). Для лізису гомогенізовані тканини інкубували у буфері 40 хв при 4 °C. Лізати центрифугували при 14 000 об./хв 15 хв при 4 °C. Кількість білка в супернатанті вимірювали за допомогою набору для вимірювання концентрації білків (Pierce, USA) та Multiscan ELISA reader (STAT FAX 2100, AWARENESS Technology Inc., USA). Зразки зберігали при температурі -70 °C до подальшого використання.

Рівень експресії PKD1 та PKD2 у гістопрепаратах АКШ досліджено шляхом Вестерн-блот-аналізу. Розділення білків проводили методом електрофорезу у 7,5% додецил-сульфат Na-поліакриламідному гелі у редуруючих умовах. Зразки наносили на гель у кількості 100 мкг на лунку, потім їх переносили на нітроцелюлозну мембрану (Immobilon-NC, Millipore corp., Billarica, MA) у камері для переносу білків (Hoefler, USA). Блокування місць неспецифічного зв'язування проводили у Tris-буферному розчині (PBS) з 0,1% твін-20 та 5% сухого знежиреного молока. Після ретельного відмивання у PBS з 0,1% твін-20 (PBS-T) мембрани інкубували з первинними антитілами (AT) у робочому розведенні протягом 2 год при кімнатній температурі. Після відмивання нітроцелюлози у PBS-T проводили інкубацію із вторинними AT, міченими пероксидазою протягом 2 год при температурі 4 °C, відмивали блоти та проводили їх інкубацію у реагенті для детекції посиленої хемілюмінесценції (PerkinElmer, Boston, MA, USA). Далі проводили експозицію на плівці для детекції реакції хемілюмінесценції (рентгенівська плівка Agfa CP-BU new, Belgium). Нами були використані кролячі AT, що розпізнають як PKD1-, так і PKD2-кіназу (люб'язно надані проф. Ван Лінтом, Бельгія), AT до PKD2 (Calbiochem, USA) і pPKD2 (Upstate, USA) та вторинні сироватки, кон'юговані з пероксидазою і адсорбовані імуноглобулінами людини (Santa Cruz, CA, USA). У якості позитивних контролей були використані лізати клітин лінії HEK293-T, трансфікованих плазмідами pcDNA3-PKD1 та pcDNA3-PKD2.

Для морфологічної верифікації діагнозу та проведення імуногістохімічних досліджень зразки тканин шлунка розміром 1–1,5 см обробляли за стандартною гістологічною технікою. Патогістологічний діагноз встановлювали при морфологічному дослідженні зрізів, забарвлених гематоксиліном та еозинном. Для визначення рівня експресії та аутофосфорильовання PKD1/2 був проведений імуногістохімічний аналіз з використанням поліклональних кролячих AT до PKD1/2 та pPKD1/2 (сайти аутофосфори-

лювання — Ser910 в PKD1 та Ser876 в PKD2), що розпізнають обидві кінази (надані проф. Ван Лінтом, Бельгія). На паралельних зрізах оцінювали кількість проліферуючих клітин за допомогою МкАТ ІРО-38 (ІЕПОР).

Парафінові зрізи товщиною 4–5 мкм прикріплювали на скельця, оброблені 0,1% розчином полі-L-лізину, і залишали в термостаті при температурі 37 °С на 30 хв. Через добу зрізи на скельцях депарафінували у ксилолі і відмивали у розчинах етилового спирту різної концентрації, після чого промивали водою. Скельця зі зрізами поміщали у цитратний буфер (рН 5,2) і обробляли 5 хв у мікрохвильовій печі для демаскування антигенів. Після цього їх охолоджували до кімнатної температури, промивали забуференим фізіологічним розчином (PBS) хлориду натрію і блокували неспецифічне зв'язування АТ сироваткою кози та 1% розчином альбуміну сироватки бика (BSA) по 30 хв відповідно. Потім на зрізи наносили первинні АТ у концентрації 20 мкг/мл і проводили інкубацію протягом 1 год при кімнатній температурі у вологій камері та промивали у PBS. Далі зрізи інкубували з системою візуалізації EnVision (DakoCytomation EnVision + System-HRP, USA). Термін інкубації становив 40 хв при кімнатній температурі. Після промивання зрізів у 3 змінах PBS для видалення реактиву, який не зв'язався, проводили виявлення активності пероксидази за допомогою діамінобензидину (DAB), (DakoCytomation, USA). Розчин для виявлення активності пероксидази наносили на зрізи на 1–3 хв. Скельця ретельно промивали водою, до забарвлювали гематоксиліном, додавали канадський бальзам і накривали покривними скельцями. У місцях локалізації антигену спостерігали гранулярне забарвлення коричневого кольору. Рівень експресії та активації білка у зразках оцінювали з використанням H-score [36]. Цей спосіб враховує інтегральний показник ступеня експресії об'єкта дослідження, визначений сумою балів, що відображає відсоток забарвлених клітин та інтенсивність забарвлення цих клітин. Підрахунок кількості клітин з різною інтенсивністю забарвлення на 1000 пухлинних клітин проводили на світловому мікроскопі Micros Austria MC-300 при загальному збільшенні $\times 400$ і фотографували, використовуючи цифрову камеру Nikon VE8400 Coolpix. Результати обчислювали за формулою: $H\text{-score} = 1 \times \text{Сл} + 2 \times \text{Пом} + 3 \times \text{Сил}$ (H-score, histological score — сума набраних імуногістохімічних балів; Сл — відсоток клітин із забарвленням слабкої інтенсивності, Пом — із забарвленням помірної інтенсивності, Сил — із забарвленням сильної інтенсивності). Оцінку ступеня експресії проводили за сумою набраних імуногістохімічних балів: 0–50 — негативний, 51–100 — низький, 101–200 — помірний, ≥ 201 — високий ступінь експресії. Для контролю дослідження рівня

експресії протеїнкінази D та рівня її фосфорилювання в АКШ взяті умовно-нормальні, максимально віддалені від пухлин ділянки шлунка, а також реактивно змінені тканини шлунка (виразка та хронічний запальний процес по типу псевдолімфоматозу).

Статистичну обробку даних проводили з використанням методів варіаційної та кореляційної статистики із застосуванням пакету прикладних програм «STATISTICA 6.0». Ступінь кореляційного зв'язку між окремими показниками визначали методом непараметричної рангової кореляції Спірмана (r). Результати вважали достовірними при коефіцієнті вірогідності $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Проведений Вестерн-блот-аналіз експресії PKD1- та PKD2-кіназ у хворих на АКШ. АТ до PKD2 розпізнавали білок розміром 105 кДа як в пухлинних, так і в умовно-нормальних тканинах (рис. 1а); при використанні АТ до PKD1 було виявлено експресію білка з молекулярною масою 120 кДа (рис. 1б). У зв'язку з тим, що анти-PKD1-АТ мають перехресну реактивність з PKD2, також було відзначено слабке забарвлення білка з молекулярною масою 105 кДа, що відповідає розміру PKD2 у контролі. АТ до Ser910 (PKD1) та Ser876 (PKD2) виявили аутофосфорилування як PKD1, так і PKD2. Оскільки в умовно-нормальних тканинах та пухлинах шлунка Вестерн-блот-аналізом нами була показана експресія як PKD1, так і PKD2, на підставі даних біохімічного дослідження можна зробити висновок, що безпосередньо в пухлинних клітинах хворих на РШ експресовані як PKD1-, так і PKD2-кінази, причому обидві кінази можуть бути аутофосфорильованими (дані в статті не наведено).

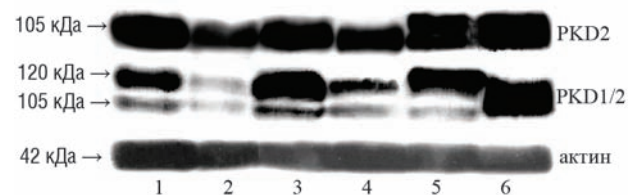


Рис. 1 Вестерн-блот-аналіз лізатів АКШ. 1, 2 — низькодиференційована АКШ (умовно-нормальна тканина, пухлина); 3, 4 — помірnodиференційована АКШ (умовно-нормальна тканина, пухлина); 5, 6 — контролю (PKD2 у pcDNA-293T та PKD1 у pcDNA-293T)

Перехресна реактивність АТ до PKD1 та PKD2 ускладнює ідентифікацію кіназ в імуногістохімічних дослідженнях. У зв'язку з цим використання АТ в імуногістохімічних дослідженнях дає можливість виявляти сумарну експресію PKD1 та PKD2, а також аутофосфорилування обох кіназ.

У табл. 1 наведені узагальнені результати гістологічних та імуногістохімічних досліджень. При дослідженні тканин з виразкою шлунка ми виявили, що клітини циліндричного епітелію мають високий рівень експресії та аутофосфорилування PKD1/2. Найвищий рівень експресії та ауто-

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

фосфорилування PKD1/2 відзначали в апікальній частині епітеліальних клітин слизової оболонки шлунка, що може бути пов'язано з участю PKD1/2 у створенні та секреторній функції апарату Гольджі. У всіх інших епітеліальних та сполучнотканинних елементах зразку виявлено помірний рівень експресії кінрази PKD1/2 у цитоплазмі та слідовий рівень аутофосфорилування PKD1/2 (рис. 2). Для епітеліальних клітин при хронічному запальному процесі по типу псевдолімфоматозу шлунка був характерним високий рівень експресії та аутофосфорилування PKD1/2 як у ядрі, так і в цитоплазмі клітин та велика кількість проліферуючих клітин (рис. 3).

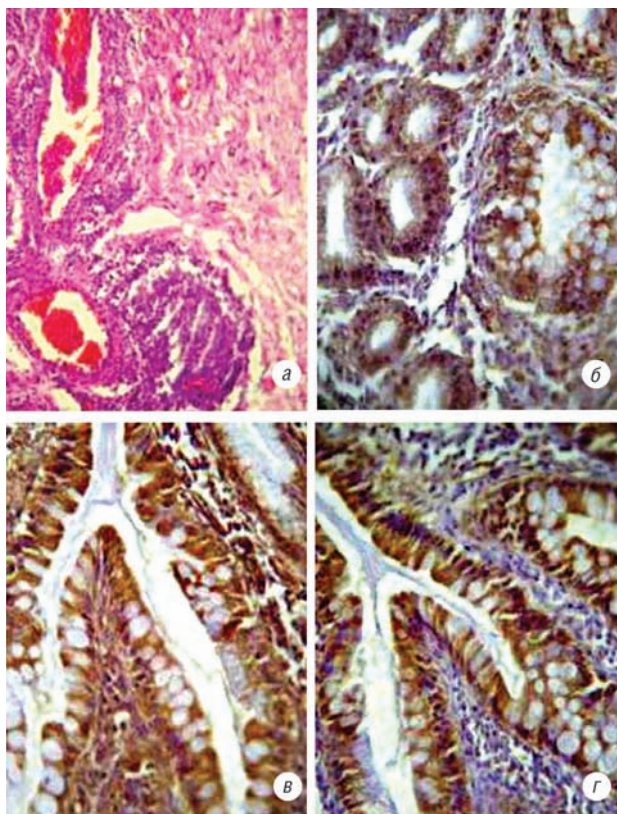


Рис. 2. Експресія та аутофосфорилування PKD1/2 у тканинах шлунка при виразці шлунка. Морфологія дослідженої ділянки (а), експресія IPO-38 (б), експресія PKD1/2 (в), експресія аутофосфорильованої PKD1/2 (г). х 400

Досліджені зразки АКШ (різного ступеня диференціювання) характеризувались гетерогенністю як за рівнем проліферації клітин (IPO-38), рівнем експресії та активності PKD1/2-кіназ, так і за їх внутрішньоклітинною локалізацією (у ядрі чи цитоплазмі клітин). Пухлинні клітини низькодиференційованих АКШ відрізнялися низьким рівнем експресії та аутофосфорилування PKD1/2 у цитоплазмі при помірній кількості проліферуючих клітин (рис. 4). Для клітин помірнодиференційованих АКШ був характерним помірний і високий рівень експресії та аутофосфорилування PKD1/2 як у цитоплазмі, так і в ядрі на фоні помірної кількості проліферуючих клітин (рис. 5).

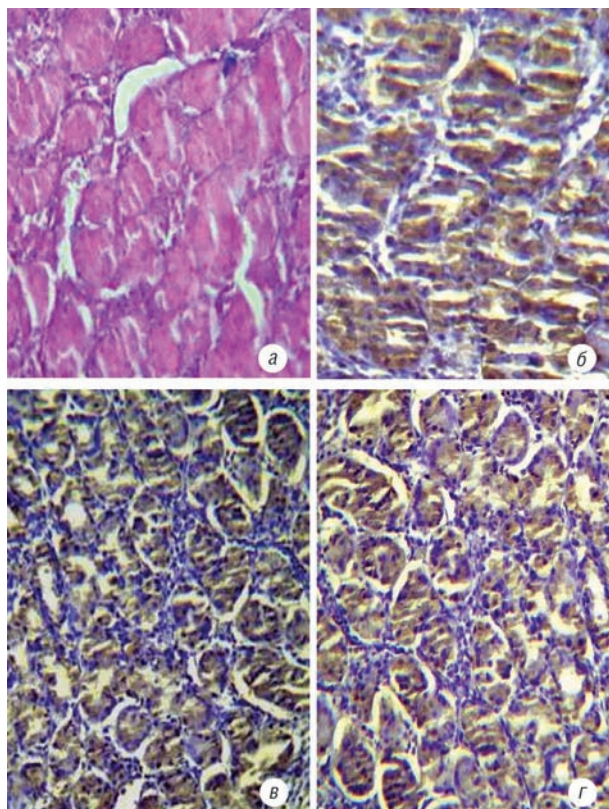


Рис. 3. Експресія та аутофосфорилування PKD1/2 у тканинах шлунка при хронічному запальному процесі по типу псевдолімфоматозу шлунка. Морфологія дослідженої ділянки (а), експресія IPO-38 (б), експресія PKD1/2 (в), експресія аутофосфорильованої PKD1/2 (г). х 400

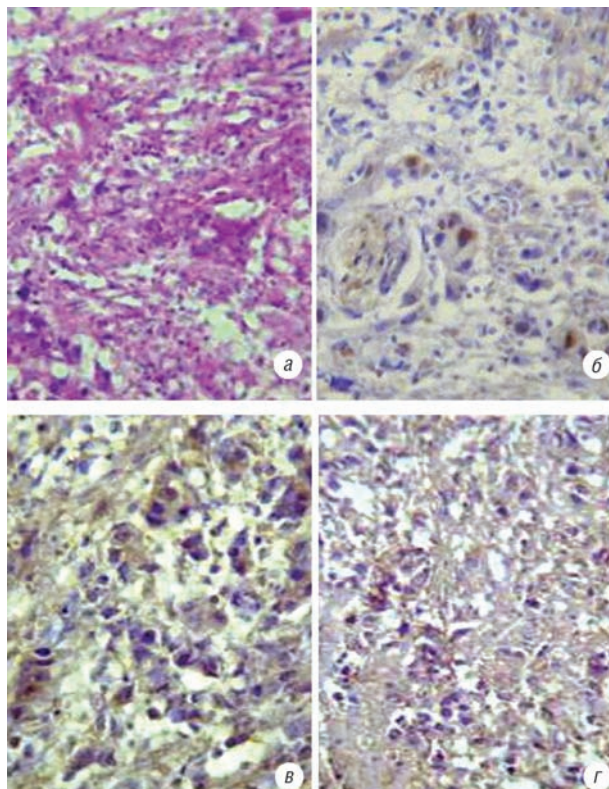


Рис. 4. Експресія та аутофосфорилування PKD1/2 у тканинах шлунка при низькодиференційованій АКШ. Морфологія дослідженої ділянки (а), експресія IPO-38 (б), експресія PKD1/2 (в), експресія аутофосфорильованої PKD1/2 (г). х 400

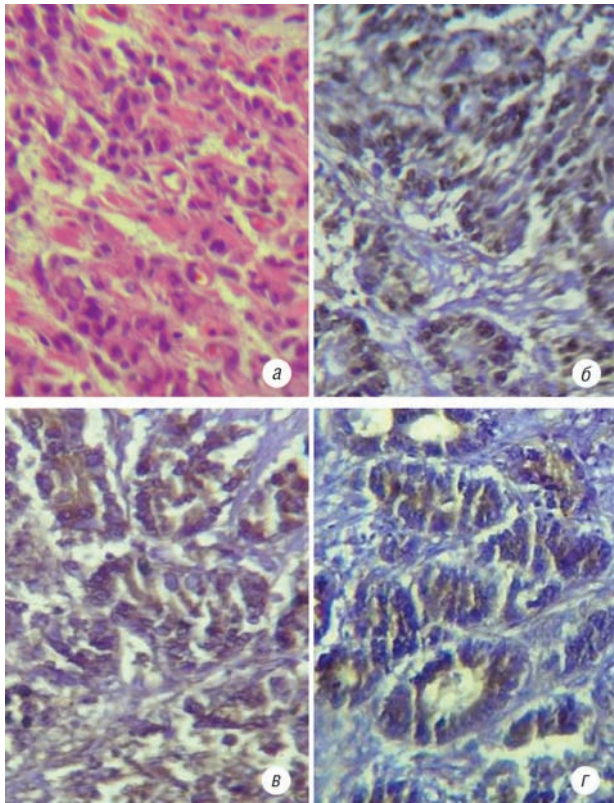


Рис. 5. Експресія та аутофосфорильовання PKD1/2 у тканинах шлунка при помірнодиференційованій АКШ. Морфологія дослідженої ділянки (а), експресія IPO-38 (б), експресія PKD1/2 (в), експресія аутофосфорильованої PKD1/2 (г). x 400

За результатами зіставлення отриманих даних із клінічними показниками у досліджуваних групах

були виділені підгрупи з урахуванням локалізації пухлин. Вищий рівень експресії PKD1/2 відзначено у пухлинах з нижньої третини шлунка, нижчий — переважно з верхньої та середньої третин шлунка (табл. 1). Можна припустити, що це пов'язано з різною кислотністю у відділах шлунка та можливою наявністю *H. pylori* у нижній третині шлунка.

Результати власних імуногістохімічних досліджень свідчать про існування відмінностей щодо експресії PKD у хворих на АКШ із різними стадіями пухлинного процесу порівняно з хворими, у яких не було пухлинних захворювань шлунка (виразка та реактивно змінені тканини). Також виявлені відмінності між рівнем експресії та фосфорильовання кінази у пухлинних тканинах та тканинах умовного контролю. Низькодиференційовані (але непомірнодиференційовані) АКШ порівняно з умовно-нормальними тканинами шлунка мали знижений рівень експресії PKD1/2-кіназ (табл. 2). Це може свідчити про можливу участь PKD-кіназ у процесах злоякісної трансформації клітин шлунка у низькодиференційованих АКШ.

У 2008 р. з'явилися перші дані літератури щодо експресії PKD1 у первинних пухлинах шлунка (РШ) та різних клітинних лініях РШ. Автори встановили, що 72,7% досліджених клітинних ліній РШ мають знижений рівень експресії PKD1, асоційований з CpG-гіперметилуванням у ділянці промотору PKD1. Було показано також, що 59,0% проаналізованих випадків первинного РШ мали вдвічі нижчу експресію PKD1 порівняно з умовно-нормальними тканинами, що також корелювало зі зменшенням метилування [37]. У той же час ав-

Таблиця 1

Рівень експресії та аутофосфорильовання PKD1/2 у хворих на АКШ (імуногістохімічні бали)

Гістологічний діагноз	Кількість випадків, n	TNM, G	Локалізація*	PKD1/2	pPKD1/2	IPO-38
Виразка шлунка	1	—	Ср/3	300	260	270
Хронічний запальний процес по типу лімфоматозу	2	—	Н/3	200	120	160
Помірнодиференційована АКШ	2	T ₄ N ₂ M ₁ G ₃ 4	Ср/3	280	260	160–180
	9	T ₃ N ₀₋₁ M ₀ G ₁₋₂ 2	Н/3	260–280	230–250	180–210
	6	T ₄ N ₁₋₂ M ₀ G ₂₋₃ 3б–4	Н-Ср/3	220–280	160–190	160–190
Помірнодиференційована АКШ із слизепродуктуванням	3	T ₃ N ₀₋₂ M ₀ G ₂ 1в–3в	Ср-Н/3	120	105	90
Низькодиференційована АКШ	5	T ₃ N ₀₋₁ M ₀ G ₃ 2–3	В-Ср/3	160	120	100–140
	6	T ₂ N ₂ M ₀ G ₂ 3б	Н-Ср/3	170	150	120
	3	T ₂₋₃ N ₁ M ₀ G ₂ 3а	В/3	120–140	100–110	90–120
Низькодиференційована АКШ із слизепродуктуванням	2	T ₃ N ₂ M ₀ G ₃ 3	Ср/3	150	120	70

*У табл. 1, 2: В/3 – верхня третина, Ср/3 – середня третина, Н/3 – нижня третина шлунка.

Таблиця 2

Рівень експресії та аутофосфорильовання PKD1/2 у АКШ порівняно з тканинами умовного контролю (імуногістохімічні бали)

Аденокарцинома	Кількість випадків, n	Локалізація*	PKD1/2		pPKD1/2		IPO-38	
			п ¹	к ²	п	к	п	к
Низькодиференційована	1	В/3	120	210	100	200	90	110
	1	В-Ср/3	160	230	120	220	100	120
	2	Ср-Н/3	160–170	270	150	200–230	120	140
Помірнодиференційована	1	В/3	160	170	90	90	140	150
	5	Ср-Н/3	240–280	250–270	210–250	210–250	160–180	140–160
	2	Н/3	240–260	240–250	220–240	220	180–210	180–190

¹п – пухлинна тканина; ²к – тканини умовного контролю.

тори не враховували рівень диференціаціювання РШ. Можливо, виявлений нами знижений рівень експресії PKD1 при низькодиференційованих АКШ порівняно з умовно-нормальними тканинами обумовлений гіперметилуванням промотору PKD1.

PKD1 відіграє важливу роль у регуляції рухливості клітин, їх міграції та інвазії. Ця кіназа впливає на процес міграції клітин через залучення $\alpha\beta 3$ -інтегрину [38]. PKD1 експресована при раку простати і асоційована зі змінами клітинної агрегації і рухливості клітин *in vitro*. При раку молочної залози PKD1 формує комплекс з актинзв'язуючим білком кортактином, а також паксиліном [39], що свідчить про участь PKD1 у контролі здатності пухлинних клітин проникати у міжклітинний матрикс та утворювати метастази. При дрібноклітинному раку легені та раку прямої кишки також відзначають гіперекспресію PKD, а існування каскаду PKC/PKD у цих клітинах вказує на важливе значення PKD у їх аутокринно-опосередкованій проліферації [40]. Тому вважаємо за доцільне проаналізувати результати власних досліджень, щоб з'ясувати, яким чином виявлена гетерогенність показників експресії та аутофосфорилювання PKD може бути пов'язана з проліферативною активністю пухлинних клітин, розповсюдженістю процесу у хворих на РШ, наявністю метастазів тощо.

У наших дослідженнях найвищий рівень експресії PKD1/2 при високому рівні pPKD1/2 у клітинах виявлений при виразці шлунка; при хронічному запальному процесі по типу псевдолімфоматозу шлунка рівень експресії PKD1/2 у цитоплазмі та в ядрі також був високим, що може свідчити про важливе значення кінази у запальному процесі (див. рис. 2, 3). При АКШ pPKD1/2 виявлено залежно від ступеня диференціювання як в ядрі, так і в цитоплазмі (більш за розміром клітини мали сильнішу ядерну реакцію). При помірnodиференційованій АКШ відзначали високий рівень експресії та фосфорилювання PKD1/2 як у ядрі, так і в цитоплазмі. При низькодиференційованій АКШ визначали низький рівень експресії та фосфорилювання PKD1/2, виключно в цитоплазмі клітин. Оскільки PKD1/2 виконують різні функції у цитоплазмі та ядрі, можливо, присутність їх у ядрі пухлинних клітин при помірnodиференційованих АКШ пов'язана з епігенетичним контролем роботи генів.

Нами були виявлені кореляції між рівнем експресії PKD1/2 і pPKD1/2 та кількістю проліферуючих пухлинних клітин залежно від рівня диференціювання АКШ. Як правило, низькодиференційовані АКШ характеризувалися помірним рівнем проліферуючих клітин і низьким рівнем експресії та аутофосфорилювання PKD1/2. Навпаки, у помірnodиференційованих АКШ був значно вищий рівень експресії IPO-38 і високий рівень експресії та аутофосфорилювання PKD1/2; існує пряма кореляція між рівнем експресії IPO-38 та PKD1/2 у ядрі пухлинних клітин ($r = 0,52$, $p < 0,05$).

Виявлена обернена кореляція між місцем локалізації пухлини і рівнем експресії pPKD1/2

у ядрі клітин ($r = -0,46$, $p < 0,05$) — чим нижче розташована пухлина, тим вищим був рівень аутофосфорилювання досліджуваних кіназ. Існує також обернена кореляція між місцем локалізації пухлини і рівнем експресії IPO-38 у ядрі пухлинних клітин ($r = -0,67$, $p < 0,05$). Можливо, зазначені особливості пов'язані зі зниженим рівнем pH у тілі шлунка та його пілоричному відділі, особливостями гістологічної будови відділів шлунка або наявністю мікроорганізмів, антигенів яких можуть активувати епітеліальні клітини шлунка, що призводить до аутофосфорилювання PKD1/2.

ВИСНОВКИ

1. Найвищий рівень експресії та аутофосфорилювання PKD1/2 виявлено при виразці шлунка, високий рівень експресії PKD1/2 — при хронічному запальному процесі по типу псевдолімфоматозу шлунка.

2. Рівень експресії та аутофосфорилювання PKD1/2 корелював з рівнем диференціювання АКШ. На фоні високого рівня експресії IPO-38 при помірnodиференційованих АКШ відзначали високий рівень експресії PKD1/2 та pPKD1/2 у ядрі та цитоплазмі, а для низькодиференційованих АКШ був характерний низький рівень експресії та аутофосфорилювання PKD1/2 у цитоплазмі при низькому рівні експресії IPO-38.

3. При помірnodиференційованих АКШ рівень експресії PKD1/2 та pPKD1/2 у пухлинних і умовно-нормальних тканинах був практично однаковий. У той же час у клітинах низькодиференційованих АКШ визначений нижчий рівень експресії цих кіназ порівняно з умовно-нормальними тканинами.

ЛІТЕРАТУРА

1. Bild AH, Yao G, Chang JT, *et al.* Oncogenic pathway signatures in human cancers as a guide to targeted therapies. *Nature* 2006; **439**: 353–7.
2. Dicken BJ, Bigam DL, Cass C, *et al.* Gastric Adenocarcinoma. Review and Considerations for Future Directions. *Ann Surg* 2005; **241** (1): 27–39.
3. Manning G, Whyte DB, Martinez R, *et al.* The protein kinase complement of the human genome. *Science* 2002; **298**: 1912–34.
4. Abedi H, Rozengurt E, Zachary I. Rapid activation of the novel serine/ threonine protein kinase, protein kinase D by phorbol esters, angiotensin II and PDGF-BB in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 1998; **427**: 209–12.
5. Zhukova E, Sinnott-Smith J, Rozengurt E. Protein kinase D potentiates DNA synthesis and cell proliferation induced by bombesin, vasopressin or phorbol esters in Swiss 3T3 cell. *J Biol Chem* 2001; **276** (43): 40298–305.
6. Matthews SA, Pettit GR, Rozengurt E. Bryostatin 1 induces biphasic activation of protein kinase D in intact cells. *J Biol Chem* 1997; **272**: 20245–50.
7. Storz P, Toker A. NF- κ B signaling an alternate pathway for oxidative stress responses. *Cell Cycle* 2003; **2**: 9–10.
8. Waldron RT, Rozengurt E. Oxidative stress induces protein kinase D activation in intact cells. Involvement of Src and dependence on protein kinase C. *J Biol Chem* 2000; **275**: 17114–21.
9. Van Lint J, Ni Y, Valius M, *et al.* Platelet-derived growth factor stimulates protein kinase D through the activation of

phospholipase C and protein kinase C. *J Biol Chem* 1998; **273**: 7038–43.

10. **Johannes FJ, Horn J, Link G, et al.** Protein kinase C μ downregulation of tumor-necrosis-factor-induced apoptosis correlates with enhanced expression of NF-kB-dependent protective genes. *Eur J Biochem* 1998; **257**: 47–54.

11. **Sturany S, Van Lint J, Gilchrist A, et al.** Mechanism of activation of protein kinase D2 (PKD2) by the CCKB/gastrin receptor. *J Biol Chem* 2002; **277** (33): 29431–6.

12. **Storz P, Doppler H, Toker A.** Activation loop phosphorylation controls protein kinase D-dependent activation of NF-kB. *Mol Pharmacol* 2004; **66**: 870–9.

13. **Storz P, Doppler H, Johannes FJ, Toker A.** Tyrosine phosphorylation of protein kinase D in the pleckstrin homology domain leads to activation. *J Biol Chem* 2003; **278**: 17969–76.

14. **Storz P, Toker A.** Protein kinase D mediates a stress-induced NF-kB activation and survival pathway. *Embo J* 2003; **22**: 109–20.

15. **Van Lint J, Rykx A, Maeda Y.** Protein kinase D: an intracellular traffic regulator on the move. *Trends Cell Biol* 2002; **12** (4): 193–200.

16. **Vertommen D, Rider M, Ni Y, et al.** Regulation of protein kinase D by multisite phosphorylation. Identification of phosphorylation sites by mass spectrometry and characterization by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 2000; **275**: 19567–76.

17. **Rykx A, De Kimpe L, Mikhalap S, et al.** Protein kinase D: a family affair. *FEBS letters* 2003; **546**: 81–6.

18. **Oancea E, Bezzerides VJ, Greka A, Clapham DE.** Mechanism of persistent protein kinase D1 translocation and activation. *Dev Cell* 2003; **4**: 561–74.

19. **Waldron RT, Rozengurt E.** Protein kinase C phosphorylates protein kinase D activation loop Ser744 and Ser748 and releases autoinhibition by the pleckstrin homology domain. *J Biol Chem* 2003; **278**: 154–63.

20. **Hausser A, Link G, Bamberg L, et al.** Structural requirements for localization and activation of protein kinase C μ (PKC μ) at the Golgi compartment. *J Cell Biol* 2002; **156**: 65–74.

21. **Jamora C, Yamanouye N, Van Lint J, et al.** G γ -mediated regulation of Golgi organization is through the direct activation of protein kinase D. *Cell* 1999; **98**: 59–68.

22. **Ponnambalam S, Baldwin SA.** Constitutive protein secretion from the trans-Golgi network to the plasma membrane. *Mol Membr Biol* 2003; **20**: 129–39.

23. **Rey O, Rozengurt E.** Protein kinase D interacts with Golgi via its cysteine-rich domain. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **287**: 21–6.

24. **Vantus T, Vertommen D, Saelens X, et al.** Doxorubicin-induced activation of protein kinase D1 through caspase-mediated proteolytic cleavage: identification of two cleavage sites by microsequencing. *Cell Signal* 2004; **16**: 703–9.

25. **Bankaitis VA.** Cell biology. Slick recruitment to the Golgi. *Science* 2002; **295**: 290–1.

26. **Rey O, Yuan J, Young SH, Rozengurt E.** Protein kinase C η /protein kinase D3 nuclear localization, catalytic activation, and intracellular redistribution in response to G protein-coupled receptor agonists. *J Biol Chem* 2003; **278**: 23773–85.

27. **Rey O, Yuan J, Rozengurt E.** Intracellular redistribution of protein kinase D2 in response to G-protein-coupled receptor agonists. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **302**: 817–24.

28. **Waldron R, Rey O, Iglesias T, et al.** Activation loop Ser744 and Ser748 in protein kinase D are transphosphorylated *in vivo*. *J Biol Chem* 2001; **276** (35): 32606–15.

29. **Verdin E, Dequiedt F, Kasler HG.** Class II histone deacetylases: versatile regulators. *Trends Genet* 2003; **19**: 286–93.

30. **Yaffe MB.** How do 14-3-3 proteins work? Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. *FEBS Lett* 2002; **513**: 53–7.

31. **Wang QJ.** PKD at the crossroads of DAG and PKC signaling. *Trends Pharmacol Sci* 2006; **27**: 317–23.

32. **Hirose F, Watanabe H, Takeichi N, et al.** Effect of experimental immune atrophic gastritis on the induction of gastric carcinoma by x-irradiation in ICR mice. *Gann* 1976; **67**: 355–64.

33. **Райхлин НТ, Кветной ИМ, Осадчук МА.** APUD-система (общепатологические и онкологические аспекты). Обнинск, 1993. 235 с.

34. **Willems G, Gepts W, Bremer A.** Endogenous hypergastrinemia and cell proliferation in the fundic mucosa in dogs. *Amer J Dig Dis* 1977; **22** (5): 419–23.

35. **Tahara E, Haizuka S.** Effect of gastroenteropancreatic endocrine hormones on the histogenesis of gastric cancer in rats induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, with special reference to development of scirrhous gastric cancer. *Gann* 1975; **66**: 421–6.

36. **Упоров АВ, Семглазов ВФ, Пожариский КМ.** Иммуногистохимическое изучение клеток рака молочной железы с использованием разных маркеров пролиферации. *Арх патологии* 2000; **62** (2): 26–30.

37. **Kim M, Jang HR, Kim JH, et al.** Epigenetic inactivation of protein kinase D1 in gastric cancer and its role in gastric cancer cell migration and invasion. *Carcinogenesis* 2008; **29** (3): 629–37.

38. **Woods AJ, White DP, Caswell PT, Norman JC.** PKD1/PKC μ promotes α v β 3 integrin recycling and delivery to nascent focal adhesions. *EMBO J* 2004; **23** (13): 2531–43.

39. **Bowden ET, Barth M, Thomas D, et al.** An invasion-related complex of cortactin, paxillin and PKC μ associates with invadopodia at sites of extracellular matrix degradation. *Oncogene* 1999; **18** (31): 4440–9.

40. **Mihailovic T, Marx M, Auer A, et al.** Protein kinase D2 mediates activation of NF-kB by Bcr-Abl in Bcr-Abl+ human myeloid leukaemia cells. *Cancer Res* 2004; **64** (24): 8939–44.

THE LEVEL OF EXPRESSION AND AUTOPHOSPHORYLATION OF PROTEIN KINASE D1 AND D2 IN GASTRIC ADENOCARCINOMA OF THE DIFFERENT LEVEL OF DIFFERENTIATIONS

M.Y. Shabelnik, T.A. Tarasova, S.V. Merencev, S.P. Sidorenko

Summary. *Was found that both PKD1 and PKD2 kinases are expressed in conditional normal and reactive tissues of stomach as well as in gastric tissues from patient with gastric adenocarcinoma. It was shown that the level of PKD1/2 expression, autophosphorylation and intracellular localization correlated with the level of adenocarcinoma differentiation. Tumors with moderate level of differentiation showed the high level of PKD1/2 expression and autophosphorylation in both cytoplasm and nucleus, but tumors with low level of differentiation are characterized by weak immunohistochemical reaction on in cytoplasm.*

Key Words: gastric adenocarcinoma, protein kinase D, nuclear antigen of proliferating cells.

Адреса для листування:

Сидоренко С.П.

03022, Київ, вул. Васильківська, 45

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України

E-mail: svitasid@onconet.kiev.ua