



ШУБА

Ярослав Михайлович — член-кореспондент НАН України, завідувач відділу нервово-м'язової фізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України

БІОФІЗИКА КАНЦЕРОГЕНЕЗУ ПРОСТАТИ: НОВИЙ ПОГЛЯД НА ПРОБЛЕМУ

Стенограма наукової доповіді на засіданні Президії НАН України 29 травня 2019 року

У доповіді обговорено результати, отримані вченими Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України у співробітництві з науковцями лабораторії клітинної фізіології Лілльського університету під час дослідження клітинних, молекулярних та біофізичних механізмів канцерогенезу простати. Досягнуті результати важливі для з'ясування фундаментальних питань залучення мембранних кальційтранспортних структур, а також змін механізмів регуляції внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу в злоякісне переродження епітеліальних клітин простати та виявлення молекулярних мішеней при лікуванні раку простати.

Шановний Борисе Євгеновичу!

Шановні члени Президії НАН України!

Не виключаю, що через назву моєї доповіді у багатьох може виникнути запитання: який стосунок біофізика може мати до раку простати? Тому одразу підкреслю, що під «біофізикою» я маю на увазі такі біофізичні характеристики клітин, як трансмембранні іонні струми та внутрішньоклітинний кальцієвий гомеостаз, досліджувати які неможливо без використання біофізичних методів електрофізіології та флуоресцентної кальційметрії. Цей підхід є новим і нетрадиційним для вивчення проблем злоякісного переродження, але останнім часом він дедалі більше привертає до себе увагу дослідників.

Оскільки більшість присутніх у цьому залі не є біологами за фахом, то перед тим як перейти безпосередньо до результатів наших досліджень, на мою думку, буде доречно, якщо я зроблю спочатку невеличкий вступ, у якому наведу базову інформацію про те, що таке іонні канали, які з них є Ca^{2+} -провідними, яка їхня роль у кальцієвому сигналюванні клітин і що являють собою так звані депо-залежні, або депо-керовані, кальцієві канали. Ця інформація, як на мене, є абсолютно необхідною для розуміння другої частини моєї доповіді, в якій я вже конкретно

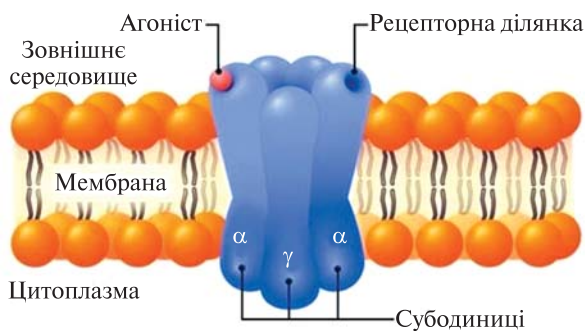


Рис. 1. Структура іонного каналу — гетеромультимеру (модифіковано з [1])

розповім про каналоформувальні білки Orai1 і Orai3, які, як виявилось, є важливими детермінантами канцерогенезу простати.

Отже, іонні канали — це білкові структури в біологічних мембранах, які утворюють трансмембранну водну пору, через яку відбувається пасивний обмін різними іонами між компартаментами (відділеннями) клітин, розділеними цими мембранами. Відкриття і закриття пори може регулюватися найрізноманітнішими фізико-хімічними чинниками середовища, що забезпечує перетворення довільних сигналів у єдину електрохімічну форму, здатну оброблятися різними системами організму.

Іонні канали зазвичай складаються з кількох білкових молекул — субодиниць, тобто вони є мультимерами. Якщо субодиниці каналу однакові, кодовані одним геном, канал називають гомомультимером; якщо субодиниці різні (наприклад, α і γ на рис. 1) — гетеромультимером.

Основними функціями іонних каналів є такі:

1) біоелектрогенез — процес, пов'язаний зі здатністю каналів пропускати струм заряджених іонів, завдяки чому може змінюватися потенціал на мембрані;

2) регуляція об'єму клітини — для підтримання тонічності клітини перенос іонів завжди супроводжується перетіканням води крізь мембрану, що супроводжується зморщуванням або набуханням клітини;

3) постачання всередину клітини іонів кальцію, який є важливим внутрішньоклітинним

сигнальним елементом. Природа обрала на цю роль саме кальцій через його здатність комплексуватися з високою спорідненістю з великою кількістю різних Ca^{2+} -чутливих білків, впливаючи при цьому на їх конформацію і функцію. Саме Ca^{2+} -транспортна функція іонних каналів є важливою в контексті нашого сьогоденного розгляду, тому я зупинюся на ній детальніше.

Іонні канали, здатні пропускати іони кальцію, називають кальційпроникними. Природа розпорядилася так, що в цитоплазмі клітини, де розгортаються основні події життєдіяльності, Ca^{2+} дуже мало, а тому на тлі такої низької концентрації навіть невелике її збільшення може виконувати сигнальну функцію. Для того щоб відбулося таке підвищення концентрації кальцію в клітині, він має або потрапити із зовнішнього простору, де його приблизно в 10 000 разів більше, ніж у цитоплазмі, або вивільнитися з внутрішньоклітинних кальцієвих депо ендоплазматичного ретикулума, в яких клітина зберігає Ca^{2+} .

Для входження кальцію ззовні є чотири основні типи Ca^{2+} -проникних каналів, які різняться залежно від того, які стимули їх відкривають:

1) потенціал-керовані канали (VOC — voltage-operated channels), які керуються змінами мембранного потенціалу;

2) канали, керовані внутрішньоклітинними вторинними посередниками (SMOC — second messenger-operated channels), тобто різними типами молекул, що напрацьовуються в клітині під час її життєдіяльності — метаболізму;

3) депо-керовані канали (SOC — store-operated channels), функціонування яких пов'язане зі ступенем наповнення внутрішньоклітинних кальцієвих депо — канали відкриваються, коли депо спустошується і його потрібно знову заповнити;

4) рецептор-керовані канали (ROC — receptor-operated channel), відкриття яких відбувається за допомогою спеціальної зовнішньоклітинної молекули-агоніста.

У клітинах епітеліальної природи, які здатні перероджуватися в ракові, основними типами

кальційпроникних каналів є SMOС (ці канали відповідають за вхід Ca^{2+} , залежний від метаболізму, — МЗВК) та SOC (ці канали відповідають за депо-керований вхід Ca^{2+} — ДКВК).

Тепер з'ясуємо, як один і той самий іон Ca^{2+} може виконувати різні сигнальні функції, які лежать в основі таких протилежних явищ, як життя і смерть, нормальна функція і канцерогенез. Це відбувається завдяки просторовому і часовому кодуванню Ca^{2+} -сигналу. Показано, що ті Ca^{2+} -сигнали, які структуровані в просторі й часі і мають вигляд хвиль, спалахів, локальних сплесків, регулюють процеси, пов'язані з життям, а великі, тривалі у часі підвищення внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} спричинюють загибель клітин, або апоптоз. Причому Ca^{2+} -проникні канали, які відповідають за життєві процеси, здебільшого належать до типу SMOС, а канали, які відповідають за апоптоз, — до типу SOC. І це зрозуміло, адже життя пов'язане з активним метаболізмом, у процесі якого напручуються різні внутрішньоклітинні біоактивні молекули — вторинні посередники, а на шляху до смерті клітина втрачає депонований Ca^{2+} , оскільки знижуються можливості його утримання, у відповідь на що активується депо-керований вхід Ca^{2+} .

Для процесу злоякісного переродження нормальних клітин у ракові характерні посилені проліферація та стійкість до апоптозу. Тобто ракові клітини розмножуються, але не гинуть. Це означає, що такі клітини повинні підтримувати динамічну кальцієву сигналізацію, за яку відповідають SMOС-канали, одночасно зменшуючи можливості для постійного депо-керованого входу Ca^{2+} завдяки зменшенню кількості SOC-каналів.

Тепер подивимося, які каналотворювальні білки відповідають за функціонування SOC- і SMOС-каналів. Щодо SOC-каналів, це вдалося з'ясувати порівняно недавно — лише 10 років тому. Виявилося, що SOC-канал, який відповідає за ДКВК, складається з білків, що належать до двох родин — Orai і STIM. Перша родина включає три представники, кодовані різними генами (Orai1, Orai2 і Orai3), а дру-

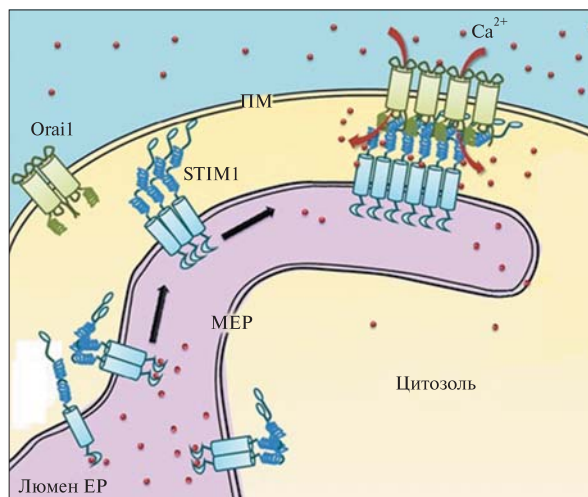


Рис. 2. Білки STIM1 і Orai1 — ключові компоненти депо-керованого входу кальцію (модифіковано з [2])

га — два (STIM1 і STIM2). Причому у процесі формування SOC-каналів задіяні лише Orai1 і STIM1, а функція інших білків все ще залишається доволі туманною. З цих двох білків Orai1 безпосередньо формує гомомультимерний Ca^{2+} -проникний канал у клітинній мембрані, а STIM1 локалізується в мембрані кальцієвого депо ендоплазматичного ретикулума, одним своїм кінцем відчуваючи, скільки у депо знаходиться кальцію. Коли концентрація кальцію падає (депо спустошується), STIM1 транслюкується у спеціальні місця, названі пунктами, в яких плазматична мембрана наближається до мембрани ендоплазматичного ретикулума, і своїм другим кінцем взаємодіє з Orai1, відкриваючи його для пропускання кальцію (рис. 2).

Вважається, що кальційпроникний SOC-канал, який утворює Orai1, є гомотетрамером, тобто сформований із чотирьох однакових Orai1-субодиниць (за новішими даними, Orai1-білки збираються у гомогексамер). Проте нещодавно виявилося, що існує принаймні ще один тип Ca^{2+} -проникного каналу, заснованого на білках родини Orai, який активується зсередини відомим ліпідним посередником — арахідоною кислотою, через що його і назвали ARC (arachidonate-regulated channel). Арахідонова кислота — це поліненасичена омега-6

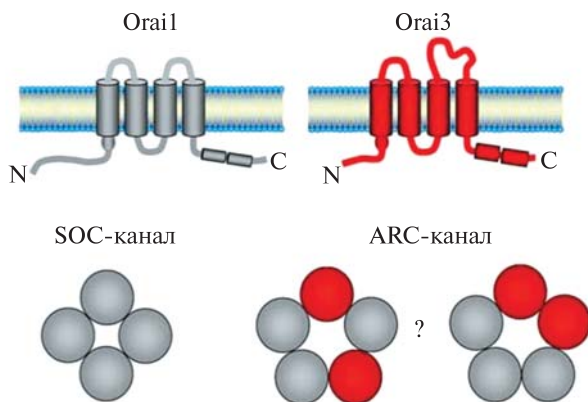


Рис. 3. Передбачувана структура SOC- та ARC-каналу (модифіковано з [3])

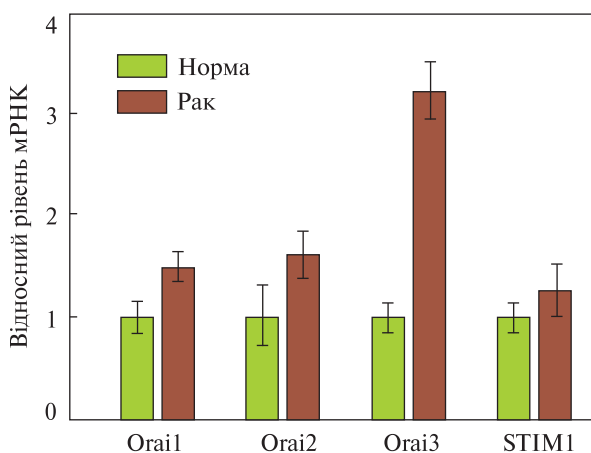


Рис. 4. У разі раку простати експресія Orai3 істотно збільшується порівняно з нормальною тканиною (дані отримано на зразках тканини простати пацієнтів, які зазнали радикальної простатектомії за клінічними показниками). За результатами [4]

жирна кислота, що є важливим сигнальним ліпідом і попередником, з якого синтезуються багато інших сигнальних молекул ліпідної природи. Її назва походить від структурно спорідненої арахідової кислоти — складової арахісового масла.

Отже, ARC-канал є представником групи SMOС-каналів, тобто каналів, що керуються вторинними посередниками. Виявилось також, що ARC-канал, на відміну від SOC-каналу, є гетеропентамером, до складу якого

крім субодиниці Orai1 входить ще субодиниця Orai3 (рис. 3). Одразу зазначу, що ані те, як ці субодиниці між собою з'єднані, ані те, як ARC-канал активується арахідовою кислотою, поки що не відомо. Припускають, що для активації потрібен також білок STIM1, і при цьому може бути декілька варіантів взаємодій між власне Orai1/Orai3-заснованим ARC, STIM1 і арахідовою кислотою, які приводять до активації входу Ca^{2+} через клітинну мембрану. Однак у контексті нашого розгляду це не є важливим. Для нас важливо, що і SOC-, і ARC-канали засновані на Orai-білках, причому Orai1 потрібен для утворення обох типів каналів, а Orai3 — тільки для ARC-каналу.

Тепер, коли ми маємо необхідну базу інформації, я розповім про отримані нами результати. Мотивом нашого дослідження була потреба з'ясувати, як шляхи надходження Ca^{2+} змінюються при канцерогенезі простати і як це може впливати на процеси, характерні для злоякісного переродження, а саме, на проліферацію і апоптоз клітин.

Насамперед ми подивилися, чи змінюється експресія (тобто кількість) білків родини Orai і родини STIM у раковій тканині простати порівняно з нормальною тканиною. Виявилось, що характерною особливістю ракової тканини є збільшення експресії Orai3 за більш-менш сталого рівня всіх інших білків (рис. 4).

Для проведення функціональних досліджень використовувати первинні тканини простати людини зі зрозумілих причин практично неможливо, а тому основними об'єктами дослідження стали дві лінії культивованих клітин, виведених з раку простати людини. Перша з них — LNCaP (lymph node carcinoma of the prostate) — андроген-чутлива клітинна лінія, започаткована в 1977 р. з метастазів раку простати у лімфатичні вузли 55-річного пацієнта. Друга — PC-3 — андроген-нечутлива клітинна лінія, започаткована в 1979 р. з кісткових метастазів 62-річного пацієнта з раком простати IV стадії (саме ця лінія часто використовується для створення ксенографтних пухлин у експериментальних тварин). Відмінність між цими лініями полягає в тому, що LNCaP збе-

рігає чутливість до дії андрогенів (чоловічих гормонів), а тому представляє менш агресивну, андроген-залежну стадію раку простати, яка підлягає терапії, а РС-3 — ні. Саме порівняння властивостей цих двох ліній дає уявлення про те, як змінюється Ca^{2+} -сигналювання при переході від менш злоякісних до більш злоякісних форм раку простати.

Лише зовні, під мікроскопом, якихось відмінностей між LNCaP- і РС-3-лініями не спостерігається. Однак якщо, використовуючи електрофізіологічні методи (за допомогою спеціальних скляних мікроелектродів, під'єднаних до електронної системи), виміряти кальцієві струми у відповідь на різні впливи, які приводять до спустошення Ca^{2+} -депо ендоплазматичного ретикулула, то виявляється, що у більш злоякісних клітин РС-3 цей струм є істотно меншим (рис. 5). Пригадуєте, я раніше говорив, що ДКВК необхідний для активації клітинної смерті — апоптозу, а тому його зменшення в клітинах РС-3 саме і є свідченням того, що ці клітини виробили резистентність до апоптозу.

Аналогічні експерименти ми провели також з використанням арахідонової кислоти як активатора струму, щоб перевірити, наскільки ефективним у цих клітинах є вхід кальцію через ARC-канали. Виявилось, що в більш агресивних, андроген-незалежних клітинах РС-3 цей струм значно більший, ніж у менш агресивних LNCaP. Причому, якщо за допомогою інтерференційних мікроРНК заглушити експресію *Orai3* в клітинах РС-3, це приводить до зменшення арахідонат-активованого струму до рівня, який спостерігається в андроген-залежних клітинах LNCaP (рис. 6). Отже, білок *Orai3* дійсно потрібен для входу кальцію, індукованого арахідоновою кислотою, і є складовою ARC-каналу.

Більше того, у повній відповідності з тим, що вхід кальцію через SMOС-канали, які активуються вторинними посередниками, потрібен для стимуляції життєвих процесів (як ми згадували раніше), культивування клітин РС-3 у присутності арахідонової кислоти стимулювало їх проліферацію. Причому заглушення

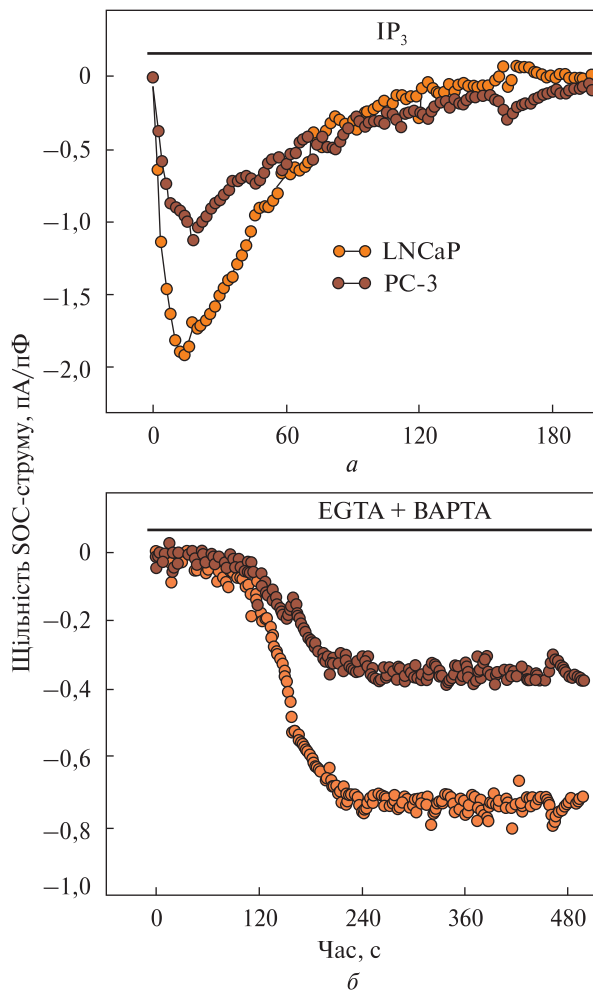


Рис. 5. Андроген-нечутливі клітини раку простати РС-3 характеризуються меншим трансмембранним депо-керованим входним струмом іонів кальцію (SOC-струмом) порівняно з андроген-чутливими клітинами LNCaP: *a* — розвиток струму у відповідь на введення у клітину IP_3 ; *б* — розвиток струму у відповідь на введення у клітину EGTA+VAPTA. За результатами [5]

Orai3 з використанням інтерференційних мікроРНК знижувало як базовий рівень проліферації, так і повністю усувало стимулювальну дію на неї арахідонової кислоти, що вказує на важливу роль у цьому процесі саме ARC-опосередкованого входу кальцію, складовою якого є білок *Orai3* (рис. 7а).

При цьому одночасно спостерігається активація відомого Ca^{2+} -залежного транскрип-

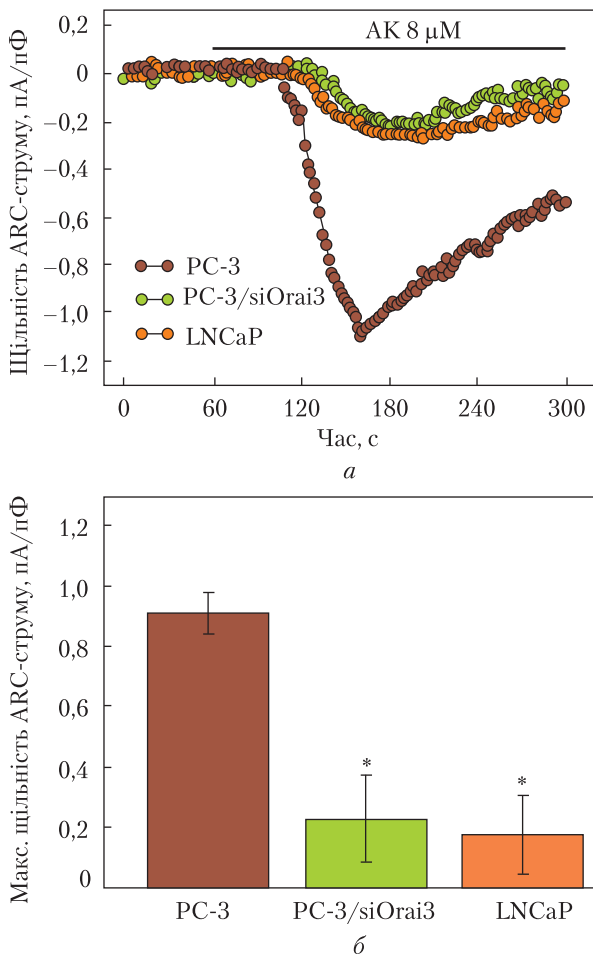


Рис. 6. Арахідонат-активованій струм в андроген-нечутливих клітинах раку простати PC-3 більший, ніж в андроген-чутливих клітинах LNCaP (а); зменшити його можна, заглушивши експресію білка Orai3 (б). За результатами [4]

ційного фактора NFAT. Саме цей фактор сприймає кальцієві сигнали і у відповідь на це активує гени, потрібні для регуляції процесів поділу клітин. Показано, що активація NFAT залежить від присутності арахідонової кислоти і її можна усунути заглушенням білка Orai3 (рис. 7б).

З отриманих нами даних випливає, що білок Orai3, експресія якого збільшується при раку простати, є важливим, з одного боку, для стимуляції проліферації клітин раку простати, а з іншого — для надання цим клітинам резис-

тентності до апоптозу, тобто Orai3 відіграє онкогенну роль. Щоб позбутися цих двох ознак канцерогенезу, білок Orai3 потрібно якимось чином заблокувати.

Щоб перевірити онкогенну сутність білка Orai3 і його потенціал як терапевтичної мішені, ми провели експерименти з ксенографтними (тобто підсадженими) пухлинами в імунодефіцитних, «голих» мишах. Контрольній групі мишей вводили інтраперитонеально 2 млн клітин PC-3, а експериментальній — такі самі клітини PC-3, а потім щодня інтерференційні мікроРНК з метою заглушення експресії білка Orai3. За мишами спостерігали впродовж 15 днів. Виявилось, що в контрольній групі пухлина прогресувала, експоненційно зростаючи в об'ємі та вазі, а в експериментальній групі прогресування фактично припинилося (рис. 8).

Отже, на основі отриманих даних ми прийшли до такої схеми онкогенної функції білка Orai3 при раку простати. У нормі існує баланс білків Orai1 і Orai3. У цьому разі утворюється фізіологічно нормальна пропорція гомомерних Orai1-заснованих SOC-каналів, які забезпечують депо-керований вхід Ca^{2+} , необхідний для індукції апоптозу, і гетеромерних Orai1/Orai3-заснованих ARC-каналів, які забезпечують арахідонат-залежний вхід кальцію, необхідний для підтримання нормальної проліферативної активності.

Порушення балансу між Orai1- і Orai3-білками в бік збільшення експресії Orai3 відіграє онкогенну роль, оскільки Orai3 відтягує на себе частину Orai1-білків, що призводить до переважного утворення гетеромерних, про-проліферативних ARC-каналів за рахунок зменшення утворення гомомерних, про-апоптичних SOC-каналів. Тобто порушення динамічної рівноваги Orai-білків одночасно спричинює появу двох ознак злого переродження — посиленої проліферації і резистентності до апоптозу.

Подібний ефект може мати надлишок або зменшення метаболізму арахідонової кислоти. Однак це не так небезпечно, оскільки арахідонова кислота хоч і може стимулювати про-

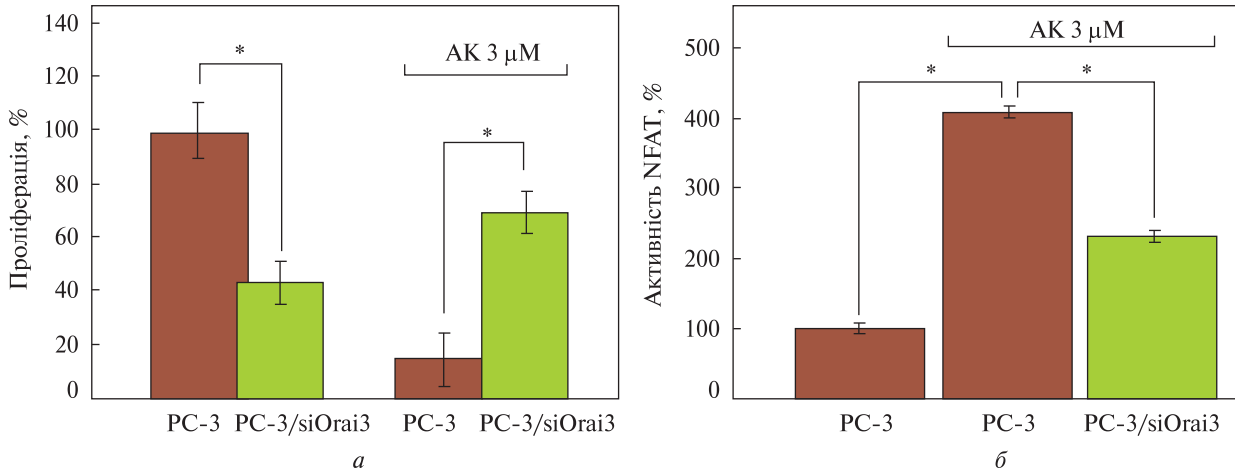


Рис. 7. Арахідонова кислота стимулює проліферацію андроген-нечутливих клітин раку простати PC-3, а заглушення Orai3 нівелює цю дію (а); так само арахідонова кислота активує Ca²⁺-залежний транскрипційний фактор NFAT у клітинах PC-3, а заглушення Orai3 зменшує цей ефект (б). За результатами [4]

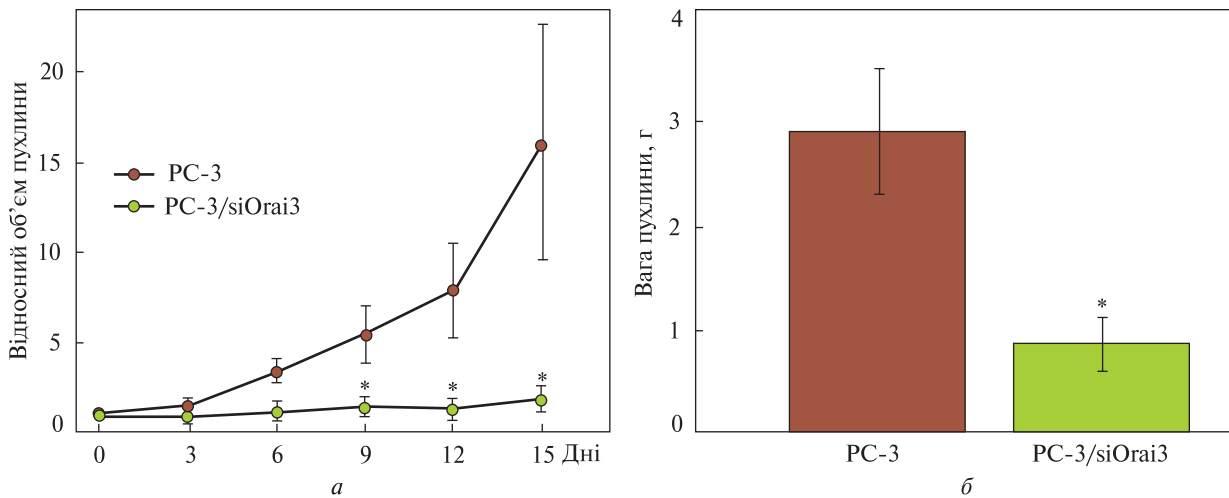


Рис. 8. Заглушення білка Orai3 позбавляє PC-3-індуковану ксенографтну пухлину в імунodefіцитних, «голих» мишах здатності прогресувати: а – зменшення відносного об'єму пухлини; б – зменшення ваги пухлини. За результатами [4]

ліферацію, але при цьому динаміка апоптозу залишається сталою.

На завершення моєї доповіді хочу попередити деякі запитання, які можуть виникнути щодо дієтичного вживання арахідонової кислоти.

Хоча питання про те, чи може дієта західного типу сприяти розвитку раку простати, давно і широко дискутується, переконливих доказів

безпосереднього зв'язку між вживанням дієтичних ліпідів і раком простати поки що немає. Найбільшим джерелом дієтичної арахідонової кислоти є м'ясо. Арахідонова кислота може також утворюватися в організмі людини з мембранних фосфоліпідів за допомогою спеціальних ферментів. Арахідонова кислота є попередником, що метаболізується в низку інших біологічно важливих ліпідних сигналів

них молекул з широким спектром дії. Вживання дієтичної арахідонової кислоти саме по собі не пов'язане з ризиком розвитку раку. Однак у разі збігу певних обставин (наприклад, надекспресія Orai3) такий ризик може виникнути. Людям із сімейною історією і генетичною схильністю до раку простати вживання біодобавок з арахідоновою кислотою та зловжи-

вання м'ясом тварин, вирощених на штучних кормах, не рекомендовано.

Слід зазначити, що представлена робота є результатом наших колаборативних зусиль з науковцями лабораторії клітинної фізіології Лілльського університету і є чудовим прикладом плідної міжнародної наукової співпраці.

Дякую за увагу!

REFERENCES

[СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ]

1. Types of Ion Channels in the Body. News-Medical.Net <https://www.news-medical.net/health/Types-of-Ion-Channels-in-the-Body.aspx>
2. Shen W.W., Demaurex N. Morphological and functional aspects of STIM1-dependent assembly and disassembly of store-operated calcium entry complexes. *Biochem. Soc. Trans.* 2012. **40**(1): 112. <https://doi.org/10.1042/BST20110620>
3. Shuttleworth T.J. STIM and Orai proteins and the non-capacitative ARC channels. *Front Biosci. (Landmark Ed)*. 2012. **17**: 847.
4. Dubois C., Vanden Abeele F., Lehen'kyi V., Gkika D., Guarmit B., Lepage G., Slomianny C., Borowiec A.S., Bidaux G., Benahmed M., Shuba Y., Prevarskaya N. Remodeling of channel-forming ORAI proteins determines an oncogenic switch in prostate cancer. *Cancer Cell*. 2014. **26**(1): 19. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.04.025>
5. Flourakis M., Lehen'kyi V., Beck B., Raphael M., Vandenberghe M., Abeele F.V., Roudbaraki M., Lepage G., Mauroy B., Romanin C., Shuba Y., Skryma R., Prevarskaya N. Orai1 contributes to the establishment of an apoptosis-resistant phenotype in prostate cancer cells. *Cell Death Dis.* 2010. **1**: e75. <https://doi.org/10.1038/cddis.2010.52>