

М.В. Богатюк¹, Е.В. Кайгородова^{1,2,3}, М.В. Завьялова^{1,2,3}, Н.А. Тарабановская¹, Е.И. Симолина¹, Е.М. Слонимская^{1,3}, В.М. Перельмутер^{1,3}

Функциональные особенности белка теплового шока 27 кДа (Hsp27) при диссонансе амплификации гена *cerbB2/neu* и экспрессии рецептора Her2/neu на мембране опухолевых клеток рака молочной железы

¹ФГБНУ «Томский научно-исследовательский институт онкологии»,

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет»,

³ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск

Проведен анализ роли молекулярного шаперона Hsp27 при дисбалансе экспрессии рецептора Her2/neu на мембране и амплификации его гена в опухолевых клетках рака молочной железы. Исследованы показатели, отражающие функциональное состояние Hsp27 (фосфорилированный статус шаперона, особенности его внутриклеточного распределения). В группе с повышенной экспрессией рецептора Her2/neu на мембране при отсутствии амплификации гена *cerbB2/neu* отмечается уменьшение количества клеток с фосфорилированной формой Hsp27 в цитоплазме по сравнению с Her2/neu-позитивной (Her2/neu(2+/3+)/FISH(+)) и негативной группой (Her2/neu(0/1+)/FISH(-)). В итоге, не исключено участие Hsp27 в феномене диссонанса амплификации гена *cerbB2/neu* и экспрессии Her2/neu на мембране опухолевых клеток рака молочной железы.

Ключевые слова: рак молочной железы, белок теплового шока 27 кДа (Hsp27), Her2/neu, амплификация *cerbB2/neu*.

Рак молочной железы (РМЖ) занимает лидирующие позиции в структуре заболеваемости и смертности женского населения; при этом, Her2/neu-позитивные опухоли встречаются, по ряду данных, в 25–30% случаев. Her2/neu (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) — продукт гена *cerbB2/neu*, локализованный на длинном плече 17 хромосомы (17q12-21.32), является представителем семейства рецепторов эпидермального фактора роста (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR). Стимуляция рецептора Her2/neu приводит к активации сигнальных путей, запускающих различные клеточные процессы (такие как пролиферация, дифференцировка, ангиогенез, метастазирование и др.). Наличие гиперэкспрессии Her2/neu на опухолевых клетках РМЖ является одним из параметров, с помощью которых РМЖ подразделяется на 5 молекулярно-генетических типов. Гиперэкспрессия Her2/

neu наблюдается при люминальном B2 (ER+, PR+, Her2/neu+, уровень Ki-67 не имеет значения) и Her2/neu-позитивном (ER–, PR–, Her2/neu+) подтипе [6,17]. Повышенная экспрессия Her2/neu предопределяет специфичность к проведению таргетной терапии в адъювантном режиме (герцептин (трастузумаб), лапатиниб). Для определения Her2-статуса РМЖ применяют иммуногистохимический анализ (оценка уровня экспрессии рецептора по балльной шкале) и гибридизацию *in situ* (FISH — fluorescence *in situ* hybridization) (оценка наличия амплификации гена *cerbB2/neu*) [18].

Несмотря на то, что в подавляющем большинстве случаев причиной гиперэкспрессии Her2/neu (3+) является амплификация гена *cerbB2/neu*, результаты крупных исследований показали, что при умеренной экспрессии Her2/neu (2+) в части случаев (от 12 до 24%) проведение FISH-анализа позволяет выявить амплификацию гена. Вместе с тем показано, что в группе больных, имевших повышенную экспрессию белка Her2/neu (2+) или (3+), но FISH-отрицательных, частота объективного эффекта терапии равна или близка нулю. Молекулярные механизмы связи повышенной экспрессии рецептора на мембране Her2/neu при отсутствии амплификации гена *cerbB2/neu* до конца не изучены [9,14].

В качестве потенциальной причины формирования диссонанса экспрессии и амплификации гена Her2/neu может быть состояние белков теплового шока (Heat shock proteins, Hsp). Hsp являются одними из самых консервативных и филогенетически древних биомолекул, которые представляют собой группу структурно сходных протеинов. Основными функциями Hsp, как молекулярных шаперонов, является фолдинг (контроль корректного формирования третичной структуры новосинтезированных белков), рефолдинг (восстановление структуры белка) и мисфолдинг (связывание неправильно свернутых протеинов). Hsp участвуют в процессах транспортировки белковых молекул через мембраны

митохондрий и ядерную оболочку, а также регулируют фолдинг многих белков, вовлеченных в различные клеточные процессы (апоптоз, пролиферация, дифференцировка, регуляция клеточного цикла и т.д.) [1,3,10,11].

Hsp27 является представителем семейства Hsp, конститутивно экспрессируется на низком уровне в физиологических условиях в нетрансформированных клетках и на повышенном — в опухолевых клетках (РМЖ, рака яичников, раке эндометрия, при лейкозах и т.д.) [2,5,8]. Hsp27 имеет большой спектр белков-мишеней, однако функциональная активность и специфичность к тем или иным протеинам зависит от его фосфорилированного статуса и внутриклеточного распределения. В ядре молекулярный шаперон может локализоваться в функциональных центрах эухроматиновых областей, регулировать экспрессию генов и участвовать в фолдинге ядерных протеинов [4]. Например, фосфорилированная форма Hsp27 стабилизирует и повышает транскрипционную активность андрогеновых рецепторов (AR) [20]. В цитоплазме Hsp27, выполняя функцию молекулярного шаперона, участвует в стабилизации Her2/neu рецептора. Предполагается, что данная взаимосвязь Her2/neu-Hsp27 является одним из механизмов, лежащих в основе отсутствия терапевтического эффекта герцептина при Her2/neu-позитивных вариантах РМЖ. Так ингибирование Hsp27 потенцирует эффект герцептина, приводит к снижению уровня экспрессии Her2/neu и подавлению пролиферативной активности клеточной линии РМЖ в эксперименте [12].

Целью настоящей работы явилась оценка особенности экспрессии шаперона Hsp27 в группе с наличием диссонанса амплификации гена *cerbB2/neu* и презентации рецептора Her2/neu на мембране опухолевых клеток (отсутствие амплификации гена *cerbB2/neu* при повышенной презентации Her2/neu рецептора на мембране), а также в группе с Her2/neu-положительным и Her2/neu-отрицательным статусом рака молочной железы.

Материалы и методы исследования

В исследование были включены 100 больных РМЖ в возрасте от 27 до 85 лет с верифицированным диагнозом инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа, проходивших лечение в клинике ФГБНУ «Томский научно-исследовательский институт онкологии» с 2009 по 2014 гг. Критериями включения пациентов в исследование были согласие пациента на участие в исследовании; клиническая стадия T1-3N0-3M0, одностороннее поражение, отсутствие неoadъювантной химиотерапии.

В качестве материала для исследования представлен биопсийный материал опухоли молочной железы. Взятые образцы опухолевой ткани фиксировали 10% раствором формальдегида, затем по стандартной методике заливали

в парафин. Срезы толщиной 5-6 мкм помещали на предметные стекла, покрытые поли-L-лизинном.

Определение уровня экспрессии фосфорилированной и нефосфорилированной формы Hsp27, Her2/neu осуществлялось иммуногистохимическим методом с соблюдением стандартов методики, инструкций фирмы-производителя и постановкой реакций на контрольных срезах. Для определения содержания шаперона Hsp27 в опухолевых клетках использовали моноклональные антитела фирмы «Abcam» к Hsp27 (клон G3.1, рабочее разведение 1:500) и его фосфорилированной форме phospho-S78 Hsp27 (клон Y175, рабочее разведение 1:300). При определении Her2/neu использовали антитела фирмы «Dako» (Дания) (поликлональные, рабочее разведение 1:500, кроличьи). Экспрессию Her2/neu, Hsp27 и pHsp27 оценивали по процентному содержанию положительно окрашенных клеток. Установление Her2/neu статуса проводилось с помощью балльной шкалы согласно критериям оценки интенсивности и типа иммунного окрашивания мембраны опухолевых клеток РМЖ по рекомендациям ASCO/CAP (2013).

Наличие амплификации гена Her2/neu выявляли FISH методом с использованием меченых флюорохромами зондов (оранжевый-SpectrumOrange к *cerbB2/neu*, зеленый-SpectrumGreen-центромерный участок 17-й хромосомы) фирмы «Abbott Molecular», набор PathVysion™ HER-2 FISH). Наличие амплификации гена Her2/neu устанавливалось путем подсчета сигналов гена Her2/neu и центромеры 17 хромосомы. При соотношении суммы сигналов гена Her2/neu к сумме сигнала 17 хромосомы больше 2.2 делалось заключение о наличии амплификации гена Her2/neu согласно рекомендациям ASCO/CAP (2013).

Работы выполнены на конфокальном микроскопе (приобретено при поддержке Минобрнауки России по Соглашению №14.594.21.0001).

Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью программы IBM SPSS Statistics 19. Проверку нормальности распределения количественных показателей проводили с использованием критерия Шапиро-Вилка. Для оценки достоверности различий между независимыми количественными выборками применяли непараметрический критерий Крускала-Уолиса. В случае обнаружения статистически значимых различий между группами проводили попарный анализ с использованием критерия Манна-Уитни. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Все пациенты были разделены на 3 группы в зависимости от экспрессии Her2/neu и наличия амплификации *cerbB2/neu*. К первой группе отнесены опухоли с ИГХ-негативной реакцией (0) и/или (1+) (Her2/neu(0/1+)FISH(–) (N=28)). Вторая группа характеризовалась гиперэкспрессией Her2/neu на (3+) и была FISH-отрицательна (группа диссонанса амплификации гена и презентации рецептора Her2/neu Her2/neu(3+) FISH(–) (N=22)), третья группа расценивалась как имеющая Her2/neu-положительный статус (Her2/neu(2+/3+)FISH(+) (N=50)).

При оценке экспрессии нефосфорилированной и фосфорилированной формы Hsp27 в ядрах опухолевых клеток рака молочной железы было выявлено достоверное ($p < 0,05$) снижение их количества в группе с диссонансом Her2/neu(3+)

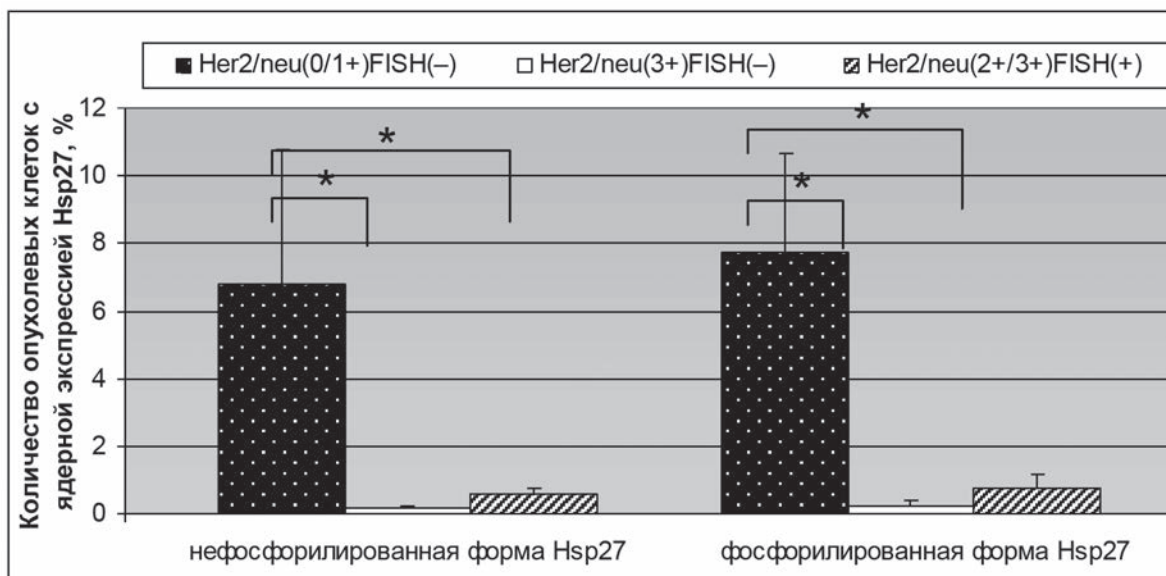


Рис.1. Особенности экспрессии Hsp27 в ядрах опухолевых клеток рака молочной железы.
Примечания: * — достоверность различий $p < 0,05$.

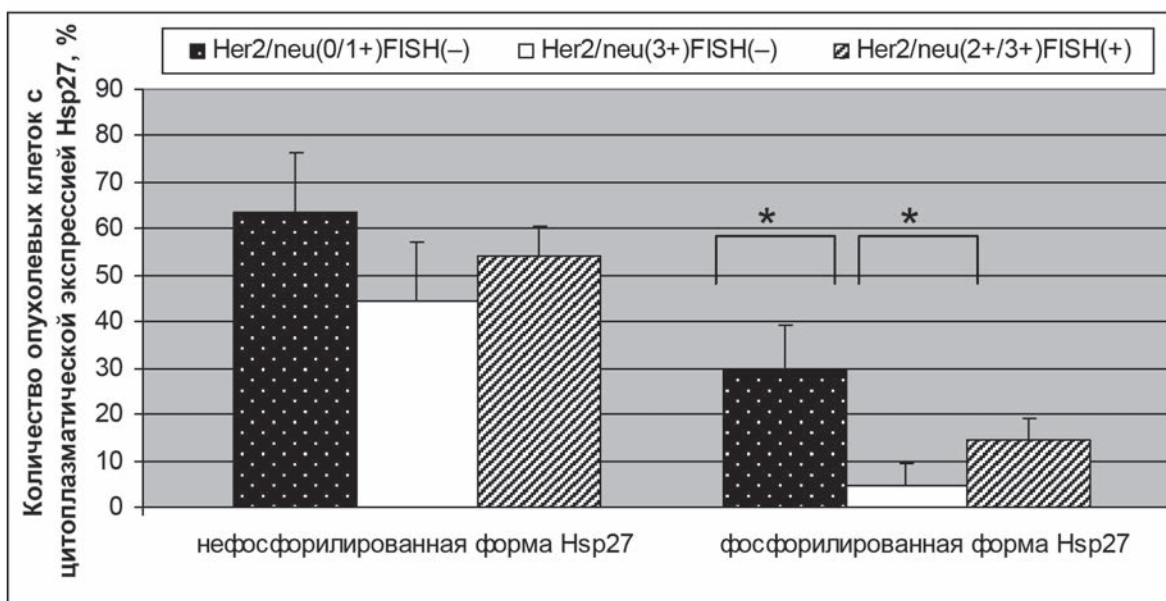


Рис.2. Особенности фосфорилированности статуса Hsp27 в цитоплазме опухолевых клеток рака молочной железы.
Примечания: * — достоверность различий ($p < 0,05$).

FISH(-) и Her2/neu(2+/3+)FISH(+) по сравнению с Her2/neu(0/1+)FISH(-) (рис.1). При этом достоверных различий между группой Her2/neu(3+)FISH(-) и Her2/neu(2+/3+)FISH(+) выявлено не было.

Такой результат позволяет предположить, что Hsp27 участвует в регуляции экспрессии Her2/neu на этапах реализации транскрипции и трансляции мРНК рецептора. В подтверждение показано, что Hsp27 регулирует стабильность мРНК (AUF-1) [13]. Этот шаперон образует комплекс с факторами инициации трансляции (eIF4F), модулирует активность сплайсинга (SRp38) [15] и усиливает экспрессию микроРНК, которые связываются с промоторной областью 3'-UTR

мРНК и ингибируют транскрипцию генов (в то время как микроРНК (miR125a и miR125b) уменьшают экспрессию Her2/neu и Her3) [7,19].

Исследование особенностей выявления Hsp27 в цитоплазме опухолевых клеток рака молочной железы показало отсутствие достоверных различий в исследуемых группах по количеству клеток с нефосфорилированной формой Hsp27. Однако, в группе с диссонансом Her2/neu(3+)FISH(-) отмечается достоверно ($p < 0,05$) более низкий уровень фосфорилированных форм молекулярного шаперона ($4,64 \pm 4,6\%$) по сравнению с группами с Her2 — положительным и отрицательным статусом (Her2/neu(2+/3+)FISH(+) ($14,42 \pm 4,8\%$) и Her2/neu(0/1+)FISH(-) ($29,4 \pm 10,1\%$)).

Полученные результаты указывают на то, что разный уровень презентации белка Her2/neu на мембране связан с экспрессией Hsp27, но не связан с амплификацией гена *cerbB2/neu*. Случай так называемого диссонанса, когда наблюдается повышенная экспрессия белка Her2/neu при отсутствии амплификации его гена в опухолевых клетках, ассоциированы со снижением активности шаперона Hsp27. По-видимому, роль Hsp27 в возникновении феномена диссонанса между максимальной экспрессией белка Her2/neu и отсутствием амплификации соответствующего гена может быть объяснена двумя различными эффектами шаперона.

С одной стороны, низкая активность Hsp27 может обуславливать высокую экспрессию набора микроРНК, регулирующего активность гена *cerbB2/neu*, причем, этот эффект одинаков как в группе с диссонансом, так и в группе с наличием амплификации гена. С другой стороны, минимальная экспрессия Hsp27 в группе с диссонансом может быть причиной снижения протеасомной деградации белка на мембране, что приводит к длительной презентации белка Her2/neu на опухолевых клетках. Такое предположение имеет определенное подтверждение в результатах работ А. Parcellier и соавт [16]. Авторы показали, что избыточная экспрессия Hsp27 в различных типах клеток усиливает каталитическую активность протеасом и деградацию белков [16]. Возможно, что именно за счет изменения уровня фосфорилирования Hsp27 в группе с диссонансом наблюдается снижение интенсивности процесса деградации некоторых протеинов, в частности Her2/neu, и, как следствие, выявляется гиперэкспрессия рецептора на мембране опухолевых клеток.

Таким образом, шаперон Hsp27 связан с экспрессией рецептора Her2/neu в опухолевых клетках рака молочной железы. Не исключено, что уровень фосфорилирования шаперона в цитоплазме является одним из факторов, способствующих гиперэкспрессии онкопротеина Her2/neu на мембране опухолевых клеток рака молочной железы при отсутствии амплификации гена *cerbB2/neu*.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов Президента № МД-168.2014.7, №МД-491.2013.7 и РНФ проект № 14-15-00350 на оборудовании Томского регионального центра коллективного пользования, приобретенного при поддержке Минобрнауки России по Соглашению №14.594.21.000.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кайгородова Е.В. Молекулярные механизмы регуляторного влияния белка теплового шока 27 кДа на апоптоз опухолевых клеток // Бюлл. сибирск. мед. — 2011. — Т. 10. (4). — С. 65-70.
2. Кайгородова Е.В., Завьялова М.В., Богатюк М.В., Перельмутер В.М. Особенности внутриклеточной локализации молекулярного шаперона Hsp27 в опухолевых клетках рака молочной железы // Международ. журнал прикладных и фундаментальных исследований. — 2014. — № 4. — С. 201-202.
3. Borges J. C., Ramos C. H. Protein folding assisted by chaperones // Protein Pept Lett. — 2005. — Vol. 12. — P. 257-261.
4. Bryantsev A. L., Chechenova M. B., Sheldena E. A. Recruitment of phosphorylated small heat shock protein Hsp27 to nuclear speckles without stress. // Experimental Cell Res. — 2007. — Vol. 313. — P. 195-209.
5. Ciocca D. R., Calderwood S. K. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications // Cell Stress & Chaperones. — 2005. — Vol. 10 (2). — P. 86-103.
6. Goldhirsch A., Winer E. P., Coates A. S. et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013 // Ann Oncol. — 2013. — Vol. 24(9) P. 2206-2223.
7. Griseri P., Pag s G. Regulation of the mRNA half-life in breast cancer // World J Clin Oncol. — 2014. — Vol. 10 (5). — P. 323-334.
8. Grzegrzolka J., Kurnol K., Piotrow P. et al. Hsp27 expression in invasive ductal breast carcinoma. // Folia Histochem Cytobiol. — 2012. — Vol. 50 (4). — P. 527-533.
9. Hanna W. M., R schoff J., Bilous M. et al. HER2 in situ hybridization in breast cancer: clinical implications of polysomy 17 and genetic heterogeneity // Mod Pathol. — 2014. — Vol. 27 (1). — P. 4-18.
10. Kaigorodova E. V., Novitskiy V. V., Bogatyuk M. V. Inhibition of Hsp27 chaperone increases apoptotic effect of etoposide in tumor cells // Int. J. Cancer Res. — 2013. — Vol. 47. — P. 1144-1148.
11. Kaigorodova E. V., Ryazantseva N. V., Novitskii V. V. et al. Effects of Hsp27 chaperone on THP-1 tumor cell apoptosis // Bull. Experim. Biol. Med. — 2012. — T. 154 (1). — C. 77-79.
12. Kang S. H., Kang K. W., Kim K. H. et al. Upregulated HSP27 in human breast cancer cells reduces Herceptin susceptibility by increasing Her2 protein stability // BMC Cancer. — 2008. — Vol. 8. — P. 286.
13. Knapinska A. M., Gratacos F. M., Krause C. D. et al. Chaperone Hsp27 modulates AUF1 proteolysis and AU-rich element-mediated mRNA degradation // Mol. Cell. Biol. — 2011. — Vol. 31. — P. 1419-1431.
14. Liu Y., Ma L., Liu D., Yang Z. et al. Impact of polysomy 17 on HER2 testing of invasive breast cancer patients // Int J Clin Exp Pathol. — 2013. Vol. 15 (7). — P. 163-173.
15. Marin-Vinader L., Shin C., Onnekink C. et al. Hsp27 Enhances Recovery of Splicing as well as Rephosphorylation of SRp38 after Heat Shock. // Mol. Biol.e Cell. — 2006. — Vol. 17. — P. 886-894.
16. Parcellier A., Schmitt E., Gurbuxani S. et al. HSP27 is a ubiquitin-binding protein involved in I-kappaB alpha proteasomal degradation // Mol. Cell. Biol. — 2003. — Vol. 23. — P. 5790-5802.
17. Perou C. M., S rlie T., Eisen M. B. et al. Molecular portraits of human breast tumours // Nature. — 2000. — Vol. 406 (6797). — P. 747-52.

18. Rakha E. A., Starczynski J., Lee A. H., Ellis I. O. The updated ASCO/CAP guideline recommendations for HER2 testing in the management of invasive breast cancer: a critical review of their implications for routine practice // *Histopathology*. — 2014. — Vol. 64 (5). — P. 609-615.
19. Sun X., Zhou Z., Fink D. J., Mata M. HspB1 silences translation of PDZ-RhoGEF by enhancing miR-20a and miR-128 expression to promote neurite extension // *Molecular and Cellular Neuroscience*. — 2013. — Vol. 57. — P. 111-119.
20. Zoubeidi A., Zardan A., Beraldi E., et al. Cooperative interactions between androgen receptor (AR) and heat-shock protein 27 facilitate AR transcriptional activity // *Cancer Res.* — 2007. Vol. 67. — P. 10455-65.

Поступила в редакцию 06.10. 2014 г.

*M.V.Bogatyuk¹, E.V.Kaigorodova^{1,2,3}, M.V.Zavialova^{1,2,3},
N.A.Tarabanovskaya¹, E.I.Simolina¹, E.M.Slonimskaya^{1,3},
V.M. Perelmutter^{1,3}*

Functional characteristics of heat shock protein 27 kDa (Hsp27) in dissonance of amplification of gene *cerbB2/neu* and expression of receptor *Her2/neu* on the membrane of tumor cells of breast cancer

¹Research Institute of Oncology
²National Research State University
³Siberian State Medical University
Tomsk

The Hsp27 molecular chaperone in dissonance of expression of receptor *Her2/neu* on the membrane and amplification of its gene in tumor cells of breast cancer was analyzed. Indicators that reflected the functional state of Hsp27 (phosphorylated status of chaperone, especially its intracellular distribution) were investigated. In the group of overexpression of receptor *Her2/neu* on the membrane in the absence of amplification of gene *cerbB2/neu* there was marked decrease in the number of cells with the phosphorylated form of Hsp27 in the cytoplasm as compared to *Her2/neu*-positive group (*Her2/neu*(2+/3+)/FISH (+)) and negative group (*Her2/neu*(0/1+)/FISH(-)). As a result, a participation of Hsp27 can not be excluded in the phenomenon of dissonance of amplification of gene *cerbB2/neu* and expression of receptor *Her2/neu* on the membrane of tumor cells of breast cancer.

Key words: breast cancer, heat shock protein 27 kDa (Hsp27), *Her2/neu*, amplification of gene *cerbB2/neu*