

Е.Е. Шашова, Н.А. Тарабановская, Е.А. Фесик, Е.М. Слонимская, И.В. Кондакова

Связь показателей протеасомной системы с распространенностью опухоли при люминальном раке молочной железы

Томский Национальный Исследовательский Медицинский Центр Российской академии наук,
НИИ онкологии, г. Томск

Целью данной работы явилось изучение особенностей функционирования протеасомной системы у больных с люминальным раком молочной железы (РМЖ). Всего в исследование было включено 124 пациентки. Выявлено, что процесс лимфогенного метастазирования у этих больных сопряжен с существенным изменением каспазаподобной активности (КПА) и субъединичного состава протеасом. При люминальном А подтипе каспазаподобная активность увеличивается в случае обширного лимфогенного метастазирования (N₂), тогда как при люминальном В раке — КПА уменьшается, и это сопровождается повышением содержания субъединиц тотального пула протеасом, регуляторных и иммунных субъединиц. Снижение КПА протеасом при люминальном В подтипе РМЖ можно рассматривать как неблагоприятный прогностический признак, ассоциированный с лимфогенным распространением опухолевого процесса.

Ключевые слова: люминальный рак молочной железы, лимфогенное метастазирование, активность протеасом, субъединичный состав протеасом.

Люминальный рак молочной железы (РМЖ) является наиболее часто встречающимся молекулярным подтипом, который характеризуется наличием позитивной экспрессии рецепторов к стероидным гормонам и высокими показателями чувствительности к эндокринной терапии [2]. Это гетерогенная группа опухолей. Так, люминальный А подтип характеризуется положительной экспрессией рецепторов эстрогенов/прогестерона, отсутствием гиперэкспрессии рецептора эпидермального фактора роста 2-го типа (HER2) и низким индексом пролиферативной активности Ki67. Люминальный В тип может быть представлен подтипами, положительными по экспрессии рецепторов к эстрогенам/прогестерону, без гиперэкспрессии HER2, с высоким индексом Ki67, а также опухолями, позитивными по экспрессии рецепторов как к стероидным гормонам, так и к HER2. Очевидно, что люминальные раки представлены довольно широким

спектром новообразований, которые неоднозначны в отношении потенции к лимфогенному и гематогенному метастазированию, а также чувствительности к проводимой антиэстрогенной терапии [11, 12, 14]. С этих позиций изучение биологического поведения этих опухолей является весьма актуальным.

На особенности развития карцином может повлиять постоянное изменение протеома, которое происходит под влиянием различных факторов в ходе трансформации нормальных клеток в опухолевые, а также при распространении онкологического процесса, что отражается в изменении регуляции рецепторов, компонентов сигнальных путей, факторов транскрипции, участвующих в формировании рака молочной железы [1]. Одним из основных путей регуляции состава и качества протеома является протеолиз, опосредуемый убиквитин-протеасомной системой. Протеасома обладает тремя основными протеолитическими активностями: химотрипсинподобной (ХПА), трипсинподобной и каспазаподобной (КПА). В клетках протеасомы осуществляют протеолиз цитозольных, ядерных белков, превращение неактивных белков — предшественников в активные, участвуют в образовании регуляторных пептидов [10]. Протеасомы могут расщеплять белки цитоскелета, актин-связывающие белки и транскрипционные факторы, регулирующие подвижность клеток и, таким образом, участвовать в процессе метастазирования [8, 9]. При развитии лимфогенных и гематогенных метастазов рака толстой кишки показано увеличение ХПА активности протеасом [6]. Ранее в наших исследованиях было выявлено, что при обширном лимфогенном метастазировании рака молочной железы наблюдается значительное угнетение активности протеасом [3], но при этом не учитывался молекулярный подтип опухоли. Также обнаружено, что в опухолевой ткани молочной железы активность и состав протеасом варьирует в зависимости от наличия или отсутствия в них рецепторов эстрогенов и прогестерона [13]. Показано, что при люминальном А раке наблюдались умеренные значения ХПА, КПА активности протеасом, в то время как люминальный В подтип характеризовался высокой

каспазаподобной активностью. Кроме того, не обнаружено ярко выраженных, специфических для различных молекулярных подтипов РМЖ изменений в содержании субъединиц протеасом [4], что может быть обусловлено динамическими изменениями их состава на этапах роста и распространения опухоли. Целью данной работы явилось изучение особенностей функционирования протеасомной системы в зависимости от подтипа люминального РМЖ и распространенности опухолевого процесса.

Материал и методы

Всего в исследование было включено 124 пациентки люминальным раком молочной железы, из них у 71 больной был диагностирован люминальный А подтип опухоли (57%), у 53 человек — люминальный В HER-2 отрицательный рак (43%). Все пациентки получали комбинированное лечение: на первом этапе выполнялось радикальное оперативное вмешательство. Проведение в адьювантном режиме химио-, гормоно- или лучевой терапии осуществлялось по показаниям. Неoadьювантное лечение не проводилось. В табл. 1 представлено распределение больных на группы в зависимости от размера опухоли и вовлечения регионарных лимфатических узлов.

Таблица 1. Распределение больных люминальным РМЖ на группы в зависимости от размера опухоли и распространенности на регионарные лимфатические узлы

		Рак молочной железы	
		люминальный А, n=71	люминальный В, n=53
Размер опухоли	T ₁	21 (30%)	16 (30%)
	T ₂	50 (70%)	37 (70%)
Распространенность на регионарные лимфоузлы	N ₀	38 (54%)	26 (49%)
	N ₁	27 (38%)	18 (34%)
	N ₂	6 (8%)	9 (17%)

Материалом для исследования явились гистологически-неизменная и опухолевая ткань молочной железы, полученные от больных РМЖ после оперативного вмешательства. Работа проведена с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основными законодательства РФ об охране здоровья граждан (Указ Президента РФ от 24.12.93 № 2288), на основании разрешения локального комитета по биомедицинской этике НИИ онкологии Томского НИМЦ.

Оценка состояния протеасомной системы проводилась путем определения химотрипсиноподобной и каспазаподобной активности протеасом флуориметрическим методом, а также содержания субъединиц протеасом методом Вестерн-блоттинг в осветленных гомогенатах, полученных из ткани РМЖ.

Определение активности протеасом. Химотрипсиноподобную активность (ХПА) и каспазаподобную активность (КПА) протеасом определяли по гидролизу специфических флуорогенных олигопептидов (Suc-LLVY-AMC и Cbz-LLG-AMC, соответственно (Sigma, США)). Реакцию проводили при 37°C в течение 20 мин. Для исключения вклада примесных протеолитических активностей в пробы добавляли специфические ингибиторы активности протеасом. Образовавшиеся продукты регистрировали на флуориметре при длине волны возбуждения 380 нм и эмиссии 440 нм. За единицу активности протеасом принимали количество фермента, при котором гидролизуется 1 нмоль соответствующего

субстрата в течение 1 мин. Удельную активность протеасом выражали в единицах активности на 1 мг белка. Содержание белка определяли по методу Лоури.

Определение экспрессии субъединиц протеасом. Экспрессия субъединиц протеасом ($\alpha 1\alpha 2\alpha 3\alpha 5\alpha 6\alpha 7$, LMP2, PA28 β) оценивалась с помощью метода Вестерн-блоттинг с применением первичных антител к субъединицам протеасом в разведении 1:500 и к β -актину (1:1500), вторичными антителами goat anti-mouse IgG-horseradish peroxidase (HRP) и goat anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, США). За 100% был принят уровень субъединиц протеасом в неизменной ткани. Проводилась стандартизация значений субъединичного состава на содержание β -актина. Результаты выражали в процентах от содержания субъединиц протеасом в неизменной ткани.

Статистическую обработку результатов проводили с применением пакета статистических программ Statistica 8.0. Многомерный анализ данных проводился с использованием непараметрического критерия Краскела-Уоллиса (F) и медианного теста. Достоверность различий между группами определяли с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни для независимых выборок. В таблицах все результаты представлены как медиана, разброс значений — как 25% — 75% квартиль. Различия считались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

При сопоставлении показателей протеасомной системы в зависимости от регионарной распространенности опухоли при люминальном А РМЖ зарегистрировано значимое изменение ХПА активности протеасом ($\chi^2 = 6,96$; $p=0,05$), КПА активности протеасом ($H = 7,62$; $p=0,04$), а также изменение содержания регуляторной PA28 β субъединицы, входящей в состав 20S протеасом ($H = 6,21$; $p=0,04$). Так, при обширном поражении метастазами регионарных лимфоузлов (N₂) наблюдается достоверное увеличение ХПА, КПА активности протеасом ($p < 0,05$), а также тенденция к увеличению содержания $\alpha 1\alpha 2\alpha 3\alpha 5\alpha 6\alpha 7$ субъединиц тотального пула ($p=0,08$) и регуляторной PA28 β субъединицы протеасом ($p=0,09$) по сравнению с больными, у которых уровень поражения регионарных лимфоузлов оценивался как N₀ и N₁ (табл.2).

При люминальном В раке изменения были зарегистрированы для КПА активности протеасом ($\chi^2 = 6,69$; $p=0,03$); содержания субъединиц тотального пула протеасом $\alpha 1\alpha 2\alpha 3\alpha 5\alpha 6\alpha 7$ ($\chi^2 = 6,96$; $p=0,03$) и тенденция к изменению регуляторной PA28 β субъединицы протеасом ($H = 5,23$; $p=0,07$). Так, в опухолях пациентов с поражением метастазами более 4 регионарных лимфоузлов (N₂) отмечено значимое снижение КПА активности при увеличенном содержании $\alpha 1\alpha 2\alpha 3\alpha 5\alpha 6\alpha 7$ и PA28 β субъединиц протеасом по сравнению с больными, у которых был менее распространенный процесс (N₀ и N₁) ($p < 0,05$). Кроме того, при N₁ и N₂ наблюдается увеличение в 2 раза содержания иммунной LMP-2 субъединицы протеасом по сравнению с больными, у

Таблица 2. Изменение показателей протеасомной системы при люминальном А и люминальном В РМЖ в зависимости от распространенности опухолевого процесса на регионарные лимфатические узлы

		Люминальный А, n=71	Люминальный В (HER2-), n=53
ХПА	N ₀	28,9 (15,7 — 64,3)	52,7 (17,8 — 116,7)
	N ₁	33,17 (14,4 — 78,9)	50,6 (22,6 — 148,9)
	N ₂	86,8 (74,3 — 148,1) ** ***(0,07)	23,7 (8,9 — 70,8) *
КПА	N ₀	45,9 (18,7 — 150,9)	126,6 (22,8–510,7) *
	N ₁	28,9 (10,1 — 70,9)	53,2 (28,2 — 150,1)
	N ₂	365,2 (184,1 –588,3) ** ***(0,09)	32,8 (17,9 — 39,8) * ** ***(0,09)
α1α2α3α5α6α7	N ₀	127,4 (82,2–255,5)	51 (28,5 –60,6) *
	N ₁	102 (67,2 — 165,3)	92 (37 — 118)
	N ₂	304,5 (257–352) *** (0,08)	121 (116 –254) *(0,08) **
LMP-2	N ₀	69 (56 — 236,5)	76,9 (52,9– 116,2)
	N ₁	72 (56 — 99,1)	157,5 (105,2 — 284) * **
	N ₂	60,2 (56 — 78,5)	182,5 (81- 284) **
РА-28	N ₀	80,4 (57,4 — 122,0)	44 (10 — 132,9)
	N ₁	134,7 (83 — 171,9)	118,9 (95 — 184)
	N ₂	697 (492-902) ** ***(0,09)	173(142 -204) * **

Значимость различий достоверна: * — по сравнению с люминальным А раком, p<0,05; **– по сравнению с N₀, p<0,05; ***– по сравнению с N₁

которых распространение на регионарные лимфоузлы отмечено не было (p<0,05) (табл. 2).

При сопоставлении показателей протеасомной системы в зависимости от размера опухоли (T₁ и T₂) не выявлено статистически значимых различий ни при люминальном А, ни при люминальном В РМЖ. Достоверных различий между показателями в зависимости от молекулярного подтипа также получено не было (данные в таблице не представлены).

Таким образом, процесс лимфогенного метастазирования при люминальных раках молочной железы сопряжен с существенным изменением каспазаподобной активности и субъединичного состава протеасом. Для люминального А подтипа характерно увеличение ХПА и КПА при обширном лимфогенном метастазировании (N₂), тогда как при люминальном В раке — активность протеасом уменьшается, и это сопровождается повышением содержания субъединиц тотального пула протеасом, регуляторных и иммунных субъединиц. Можно полагать, что статистически значимое снижение каспазаподобной активности протеасом, проявляющееся при люминальном В РМЖ с наличием распространения опухоли на регионарные лимфоузлы, связано с формированием иммунопротеасом. Известно, что каталитические иммунопротеасомы (LMP-2 и LMP-7), благодаря усиленной экспрессии, встраиваются во вновь собирающи-

еся частицы протеасомы вместо конститутивных субъединиц, формируя иммунопротеасомы. Последние отличаются от обычной протеасомы субстратной специфичностью и обладают пониженной каспазаподобной активностью [7]. Кроме того, снижение активности протеасом может быть вызвано нарушением процессов посттрансляционной модификации их субъединиц (например, фосфорилированием). В частности, в некоторых экспериментальных работах продемонстрировано, что блокирование фосфорилирования Rpt3-T25 ингибирует 26S протеасомную активность примерно на 30%. При этом снижаются все 3 типа пептидазной активности [5]. А это, в свою очередь, может приводить к накоплению многих белков в гипер-убиквитированных формах.

Таким образом, при обширном лимфогенном метастазировании люминального В рака молочной железы складывается ситуация, при которой на фоне высокого содержания иммунных, регуляторных субъединиц и субъединиц тотального пула протеасом, наблюдается низкая протеолитическая активность. Вероятно, низкие значения каспазаподобной активности протеасом при люминальном В подтипе РМЖ можно рассматривать как неблагоприятный прогностический признак, сопряженный с лимфогенным распространением опухолевого процесса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Моисеенко Ф.В., Волков Н.М., Богданов А.А., и др. Современные возможности клинического применения экспрессионного типирования опухолей молочной железы // Вопросы онкологии. — 2016. — Т. 62. — № 2. — С. 31-34.
2. Семиглазов В.Ф., Палтуев Р.М., Семиглазов В.В. и др. Общие рекомендации по лечению раннего рака молочной железы St.Gallen-2015, адаптированные экспертами Российского общества онкоммаммологов // Опухоли женской репродуктивной системы. — 2015. — № 3. — С. 43–60.
3. Шашова Е.Е., Кондакова И.В., Слонимская Е.М. и др. Изменение химотрипсинподобной и каспазоподобной активностей протеасом в зависимости от степени распространенности рака молочной железы // Сибирский онкологический журнал. — 2013. — Т. 59. — № 5. — С. 45-49.
4. Шашова Е.Е., Дорошенко А.В., Бондарь Л.Н. и др. Протеасомная и кальпаиновая протеолитические системы при различных молекулярных подтипах рака молочной железы // Сибирский онкологический журнал. — 2017. — Т. 16(3). — С. 33-39.
5. Guo X., Wang X., Wang Z. et al. Site-specific proteasome phosphorylation controls cell proliferation and tumorigenesis // Nat Cell Biol. — 2016. — Vol. 18(2). — P. 202–212.
6. Ivanova E.V., Kondakova I.V., Spirina L.V. et al. Chymotrypsin-like activity of proteasomes and total calpain activity in gastric and colorectal cancer // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. — 2014. — Vol. 157(6). — P. 781-784.
7. Joyce S. Immunoproteasomes edit tumors, which then escapes immune recognition // Eur. J. Immunol. — 2015. — P. 1–5.
8. Kondakova I.V., Yunusova N.V., Spirina L.V. et al. Association between intracellular proteinase activities and the content of locomotor proteins in tissues of primary tumors and metastases of ovarian cancer // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. — 2014. — Vol. 40(6). — P. 681-687.
9. Liu F, Zhou J, Zhou P, et al. The ubiquitin ligase CHIP inactivates NF- κ B signaling and impairs the ability of migration and invasion in gastric cancer cells // Int. J Oncol. — 2015. — Vol. 46(5). — P. 2096 — 2106.
10. Lub S., Maes K., Menu E., et al. Novel strategies to target the ubiquitin proteasome system in multiple myeloma // Oncotarget. — 2016. — Vol. 7(6). — P. 6521-6537.
11. Molnár I.A., Molnár B.Á., Vízkeleti L. et al. Breast carcinoma subtypes show different patterns of metastatic behavior // Virchows Arch. — 2017. — Vol. 470(3). — P. 275-283.
12. Perou C.M. Molecular Stratification of Triple-Negative Breast Cancers // The Oncologist. — 2011. — Vol. 16(1). — P. 61-70.
13. Shashova E.E., Lyupina Y.V., Glushchenko et al. Proteasome Functioning in Breast Cancer: Connection with Clinical-Pathological Factors // PLoS ONE. — 2014. — Vol. 9(10). — e109933.
14. Thangarajah F., Enninga I., W. Malter S. et al. Retrospective analysis of Ki-67 index and its prognostic significance in over 800 primary breast cancer cases // Anticancer Res. — 2017. — Vol. 37(4). — P.1957-1964.

Поступила в редакцию 07.11.2017 г.

*E.E. Shashova, N.A. Tarabanovskaya, E.A. Fesik,
E.M. Slonimskaya, I.V. Kondakova*

Relations of proteasomal system with tumor stage in luminal breast cancer

Tomsk National Research Medical Center
(Tomsk Cancer Research Institute)
Tomsk

The aim of this study was to investigate characteristics of the proteasomal system in luminal breast cancer. There were included 124 patients with primary luminal breast cancer in stage T₁₋₃N₀₋₂M₀ who had not received neoadjuvant treatment. The process of lymphogenous metastasis was associated with a significant change in caspase-like activity (CL) and subunit composition of proteasomes. CL activity of proteasomes was increased in luminal A breast cancer with extensive lymphogenic metastasis (N₂), while it was decreased in the luminal B subtype of cancer. It was accompanied by an increase in the composition of the proteasomal total pool subunits, regulatory and immune subunits. Decrease in CL activity of proteasomes can be poor prognostic sign which is associated with the lymphogenous invasion of the tumor process in luminal B breast cancer.

Key words: luminal breast cancer, lymphogenous metastasis, proteasomal activity, subunit composition of proteasomes