

ИЗМЕНЕНИЕ ХИМОТРИПСИНПОДОБНОЙ И КАСПАЗОПОДОБНОЙ АКТИВНОСТЕЙ ПРОТЕАСОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТЕПЕНИ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Е.Е. Шашова¹, И.В. Кондакова¹, Е.М. Слонимская^{1,2}, С.А. Глущенко¹,
Е.С. Колегова²

ФГБУ «НИИ онкологии» СО РАМН, г. Томск¹
ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Томск²
634050, г. Томск, пер. Кооперативный, 5,
e-mail: SchaschovaEE@oncology.tomsk.ru¹

Изучена химотрипсинподобная и каспазоподобная активность протеасом в тканях рака молочной железы от 74 больных РМЖ. Показано, что при РМЖ химотрипсинподобная и каспазоподобная активности протеасом в опухолевой ткани выше по сравнению с неизменной тканью. Выявлено, что при большей распространенности опухолевого процесса увеличивается активность протеасомной системы. В то же время при обширном лимфогенном метастазировании наблюдается значительное угнетение активности протеасом, что в дальнейшем может рассматриваться в качестве неблагоприятного прогностического признака. Кроме того, выявленная динамика функционирования протеасомной системы в зависимости от распространенности онкологического процесса свидетельствует о важной роли внутриклеточного протеолиза в прогрессировании рака молочной железы.

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

CHYMOTRYPSIN-LIKE AND CASPASE-LIKE PROTEASOME ACTIVITIES IN BREAST CANCER

E.E. Shashova¹, I.V. Kondakova¹, E.M. Slonimskaya^{1,2}, S.A. Glushenko¹, E.S. Kolegova²

Cancer Research Institute, SB RAMS, Tomsk¹,
Siberian State Medical University, Tomsk²
5, Kooperativny Street, 634050-Tomsk, Russia,
e-mail: chaschovaEE@oncology.tomsk.ru¹

The chymotrypsin-like and caspase-like proteasome activities were studied in tumor tissues of 74 patients with breast cancer (BC) T₁₋₄N₀₋₃M₀ in association with tumor size and lymph node involvement. Chymotrypsin-like and caspase-like proteasome activities were higher in breast cancer tissue than in adjacent tissues. We showed that advanced BC is accompanied by increase in chymotrypsin-like and caspase-like proteasome activities. In tumors with lymph node dissemination, proteasome activity was significantly decreased, which may have prospective prognostic value. Taken together, our data indicate an important role of intracellular proteolysis in BC progression.

Key words: breast cancer, proteasome activity, lymph node metastasis.

Исследование молекулярного патогенеза рака молочной железы (РМЖ) является приоритетным направлением современной онкологии в связи с высокой распространенностью, смертностью и гетерогенностью этого заболевания. В настоящее время актуальным является поиск новых подходов к прогнозированию течения этого заболевания [2, 7]. Современные прогностические критерии должны отражать патогенетические особенности рака молочной железы и быть связаны с различными механизмами реализации терапевтического эффекта. С этих позиций показатели протеасомной системы являются важными компонентами, которые могут

оказывать влияние на исход рака молочной железы. Это обусловлено тем, что протеасомы играют ключевую роль в таких клеточных процессах, как регуляция апоптоза, пролиферации и клеточного цикла, противоопухолевого действия иммунной системы, неоангиогенеза, прогрессии, инвазии и метастазирования злокачественных опухолей [3, 4, 13, 19–21].

Протеасомы, обладая трипсинподобной, химотрипсинподобной и каспазоподобной активностями, обеспечивают разрезание связей после основных гидрофобных и кислых аминокислот, соответственно, обеспечивая модификацию структуры белков и

влияя, таким образом, на их функциональную активность [5, 22]. Кроме того, нарушение эффективной регуляции количества и функции многих белков, в том числе рецепторов факторов роста и половых стероидных гормонов, являющихся мишенями терапевтического воздействия при РМЖ, неразрывно связано с избирательной деградацией, которую в клетке осуществляет протеасомная система. В ряде работ показано, что протеасомы контролируют количество рецепторов эстрогенов, прогестерона и рецепторов эпидермального фактора роста [11, 15, 17, 18]. В экспериментальных исследованиях на модели РМЖ у животных продемонстрировано уменьшение размера опухоли молочной железы при применении ингибитора протеасом бортезомиба [10].

В настоящее время большинство работ по изучению протеасом проводятся на культурах опухолевых клеток [9, 18], что не всегда позволяет экстраполировать полученные данные на первичные опухоли человека. Практически отсутствуют сведения о связи активности протеасом с лимфогенным метастазированием. Ранее на клиническом материале не изучалась каспазоподобная активность протеасом, хотя в отдельных публикациях было показано, что применение ингибиторов протеасом, в том числе и Велкейда, способствует угнетению и химотрипсинподобной, и каспазоподобной активностей протеасом [12].

Цель исследования – изучение химотрипсинподобной и каспазоподобной активностей протеасом в тканях рака молочной железы при различной распространенности процесса.

Материал и методы

Исследовалась опухолевая ткань, взятая после выполненного радикального хирургического вмешательства от 74 больных РМЖ T₁₋₄N₀₋₃M₀ стадии, в возрасте 28–85 лет, не получавших неoadьювантную химиотерапию. Во всех случаях была проведена морфологическая верификация опухолевой и неизменной ткани молочной железы. Наиболее частой гистологической формой был инвазивный протоковый рак (78 %), в 14 % случаев выявлен инвазивный дольковый рак, в 8 % опухоли были представлены другими гистологическими типами (медулярный, слизистый).

Оценка состояния протеасомной системы проводилась путем определения химотрипсинподобной и каспазоподобной активностей протеасом. На первом этапе для определения активности про-

теасом из изучаемых тканей получали осветленные гомогенаты. Гомогенат центрифугировали 60 мин при 10000g и 4°C.

Химотрипсиноподобную активность протеасом (ХТП) и каспазоподобную активность протеасом (КП) определяли в осветленных гомогенатах опухолевых и неизменных тканей по гидролизу различных флуорогенных олигопептидов. Для определения химотрипсинподобной активности протеасом в качестве олигопептида использовали Suc-LLVY-AMC (Sigma, США), который расщепляется химотрипсинподобными центрами протеасом [8]. Для оценки каспазоподобной активности протеасом в качестве олигопептида использовали Cbz-LLG-AMC (Sigma, США). Реакцию проводили при 37°C в течение 20 мин. Для исключения вклада примесных протеолитических активностей в пробы добавляли 7 мкМ MG132 (Sigma, США), ингибитора активности протеасом. Образовавшийся продукт регистрировали на флуориметре «ФФМ-1» (Япония) при длине волны возбуждения 380 нм и эмиссии 440 нм. Окончательные расчеты проводили по разнице между полной и остаточной активностями в присутствии MG132. За единицу активности протеасом принимали количество фермента, при котором гидролизуются 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 [16].

Статистическую обработку результатов проводили с применением пакета статистических программ Statistica 8.0. Для многомерного обобщения проводился дисперсионный анализ (критерий Краскела–Уоллиса (H)). При попарном сравнении групп использовался критерий Манна–Уитни. При проведении корреляционного анализа использовался метод Спирмена. В табл. 1 значения представлены как медиана, разброс значений – как 25–75 % квартиль. Различия считались значимыми при p<0,05.

Результаты и обсуждение

Установлено, что при РМЖ медианные значения химотрипсинподобной и каспазоподобной активности протеасом в опухолевой ткани выше в 2,29 и в 2,26 раза соответственно, по сравнению с неизменной тканью (p<0,05) (табл. 1). Кроме того, выявлена прямая корреляционная взаимосвязь между химотрипсин- и каспазоподобной активностью протеасом в опухоли (R=0,42; p=0,004). Анализируя

активность протеасом в опухолевой и неизменной ткани, следует отметить, что полученные результаты по изменению каспазоподобной активности протеасом уникальны, так как в литературе отсутствуют работы по изучению этой активности у онкологических пациентов.

Полученные результаты о химотрипсинподобной активности протеасом созвучны имеющимся в литературе данным не только при РМЖ, но и при других локализациях: рак эндометрия, плоскоклеточных карциномах головы и шеи [1, 6, 14]. Можно полагать, что увеличение активности протеасом в опухоли по сравнению с неизменными тканями обусловлено усилением процессов внутриклеточного протеолиза при опухолевом росте. Чтобы клетке продолжать свое существование, необходимо усилить систему, занимающуюся деградацией выполнившего свою функцию белкового и пептидного материала. При этом может происходить увеличение синтеза протеасомных субъединиц путем регуляции транскрипции генов, изменение на этапе их сборки или изменение качества и количества белков, принимающих участие в контроле протеасом-зависимого протеолиза

[23]. Кроме того, в опухолях возможно усиление и/или нарушение механизма обратной связи между активностью протеасом и транскрипцией их генов. Было показано, что после воздействия протеасомных ингибиторов в клетке усиливается биосинтез протеасом de novo, причем этот феномен сильнее выражен в опухолях по сравнению с нормальными тканями [24].

Важным критерием, влияющим на прогноз заболевания, является распространенность опухолевого процесса, включающая в себя размер новообразования и вовлеченность в опухолевый процесс регионарных лимфатических узлов. Распространенность косвенно отражает агрессивность опухолевого процесса и частично отражает биологические особенности самой опухоли. При оценке связи активности протеасом с размером новообразования было выявлено достоверное повышение как химотрипсинподобной, так и каспазоподобной активности протеасом при местнораспространенных формах рака (T_{3-4}) по сравнению с опухолями меньшего размера (табл. 2). Вероятно, высокая активность протеасом при опухолях большого размера вызвана

Таблица 1

Химотрипсинподобная (ХТП) и каспазоподобная (КАС) активность протеасом в опухолевой и неизменной ткани больных РМЖ

Тип ткани	Активность протеасом в опухолевой ткани, $\times 10^3$ Ед/мг	
	ХТП	КАС
Неизменная ткань	12,46 (6,9–22,3)	13,98 (7,65–26,88)
Опухолевая ткань	28,63 (14,94–56,73)*	31,73 (16,6–59,79)*
К=оп/неизм	2,29 (1,25–4,71)	2,26 (1,45–3,98)

Примечание: К – коэффициент соответствующей активности протеасом, который представляет их отношение в опухоли и в неизменной ткани; * – различия значимы по сравнению с неизменной тканью ($p < 0,05$).

Таблица 2

Химотрипсинподобная (ХТП) и каспазоподобная (КАС) активность протеасом в опухолевой ткани больных РМЖ в зависимости от стадии

Стадия	Активность протеасом в опухолевой ткани, $\times 10^3$ Ед/мг	
	ХТП	КАС
В зависимости от критерия T		
$T_{1-2}N_{0-3}M_0$, n=63	23,8 (12,58–45,4)	29,17 (11,23–45,2)
$T_{3-4}N_{0-3}M_0$, n=10	69,67 (34,9–134,7)*	63,34* (40,17–113,8)
В зависимости от критерия N		
$T_{1-4}N_{0-1}M_0$, n=57	27,45 (15,65–49,4)**	30,75 (11,9–53,25)**
$T_{1-4}N_{2}M_0$, n=12	43,05 (15,07–88)	78,8 (39–128,2)
$T_{1-4}N_{3}M_0$, n=4	24,67 (8,22–86,1)	20,58 (7,87–33,28)**

Примечание: * – различия значимы по сравнению с группой больных РМЖ $T_{1-2}N_{0-3}M_0$ стадии ($p < 0,05$); ** – различия значимы по сравнению с группой больных РМЖ $T_{1-4}N_{2}M_0$ стадии ($p < 0,05$).

активными процессами протеолиза обработанных и поврежденных белков, которые являются субстратом для усиленного опухолевого роста.

Также обнаружена волнообразная динамика изменения ХТП и КАС активностей протеасом в зависимости от степени вовлеченности в онкологический процесс регионарных лимфатических узлов. Методом дисперсионного анализа было показано, что каспазоподобная активность протеасом в опухолевой ткани значимо различалась в зависимости от вовлеченности в опухолевый процесс регионарных лимфатических узлов ($H(2)=7,7$; $p<0,05$). При более детальном рассмотрении внутригрупповых отличий активности протеасом показано, что в прогностически благоприятной группе по лимфогенной распространенности (N_{0-1}) были выявлены умеренные значения как ХТП, так и КАС активности. При N_2 наблюдалось максимальное повышение химо-трипсинподобной и каспазоподобной активностей протеасом в опухоли ($p<0,05$). В группе с наименее благоприятным прогнозом (N_3), при большом количестве лимфоузлов, вовлеченных в процесс метастазирования, наблюдалось выраженное снижение этих активностей, что, вероятно, можно рассматривать как неблагоприятный прогностический признак, характеризующий отсутствие адекватной регуляции протеасомной системы (табл. 2). Следует отметить, что наиболее выраженные изменения были выявлены для каспазоподобной активности протеасом. Это может быть связано с тем, что при ингибировании каспазоподобной активности протеасом происходит накопление убиквитинированных белковых конъюгатов [5], что, вероятно, может стимулировать лимфогенное метастазирование.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что при большей распространенности опухолевого процесса изменяется активация протеасомной системы. При обширном лимфогенном метастазировании наблюдается значительное угнетение активности протеасом, что в дальнейшем может рассматриваться в качестве неблагоприятного прогностического признака. Кроме того, выявленная динамика функционирования протеасомной системы в зависимости от распространенности онкологического процесса свидетельствует о важной роли внутриклеточного протеолиза в прогрессировании рака молочной железы. Очевидно, что исход заболевания определяется не только распространенностью заболевания, но в большей мере биологическими

особенностями опухоли, этот аспект нуждается в дальнейшем, более углубленном изучении.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (грант 13-04-00169А).

ЛИТЕРАТУРА

1. Кондакова И.В., Спирина Л.В., Шашова Е.Е. и др. Активность протеасом в опухолях женской репродуктивной системы // Биоорганическая химия. 2012. Т. 38, № 1. С. 106–110.
2. Середа Е.Е., Кондакова И.В., Слонимская Е.М. Ферменты метаболизма эстрогенов и рецепторы как факторы риска развития и прогноза при раке молочной железы // Сибирский онкологический журнал. 2004. № 1 (9). С. 35–43.
3. Спирина Л.В., Кондакова И.В., Усынин Е.А. и др. Активность протеасом в тканях злокачественных опухолей различных локализаций // Сибирский онкологический журнал. 2009. № 5 (35). С. 49–52.
4. Спирина Л.В., Кондакова И.В., Усынин Е.А. и др. Регуляция экспрессии транскрипционных факторов и фактора роста эндотелия протеасомной системой при метастазировании рака почки // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. 2012. Т. 23, № 1. С. 27–32.
5. Цимоха А.С. Протеасомы: участие в клеточных процессах // Цитология. 2010. Т. 52, № 4. С. 277–300.
6. Чоинзонов Е.Л., Спирина Л.В., Кондакова И.В. и др. Роль внутриклеточных протеиназ в регуляции экспрессии транскрипционных факторов HIF-1, NF- κ B и фактора роста сосудов при лимфогенном метастазировании плоскоклеточных карцином головы и шеи // Бюллетень СО РАМН. 2012. № 6. С. 15–21.
7. Шашова Е.Е., Кондакова И.В., Слонимская Е.М. и др. Сравнительное изучение содержания рецепторов эстрогенов и прогестерона в неизменной, опухолевой и метастатической тканях при раке молочной железы // Сибирский онкологический журнал. 2008. № 4 (28). С. 42–45.
8. Ben-Shahar S., Komlosch A., Nadav E. et al. 26 S proteasome-mediated production of an authentic major histocompatibility class I-restricted epitope from an intact protein substrate // J. Biol. Chem. 1999. Vol. 274 (31). P. 21963–21972.
9. Ha N.-H, Nair V.S., Reddy D.N. et al. Lactoferrin-endothelin-1 axis contributes to the development and invasiveness of triple-negative breast cancer phenotypes // Cancer Res. 2011. Vol. 71. P. 7259–7269.
10. Jones M.D., Liu J.C., Thomas K. A Proteasome Inhibitor, Bortezomib, Inhibits Breast Cancer Growth and Reduces Osteolysis by Downregulating Metastatic Genes // Clin. Cancer Res. 2010. Vol. 16. P. 4978–4989.
11. Kretzer N.M., Cherian M.T., Mao C. et al. A Noncompetitive small molecule inhibitor of estrogen-regulated gene expression and breast cancer cell growth that enhances proteasome-dependent degradation of estrogen Receptor- α // J. Biol. Chem. 2010. Vol. 285 (53). P. 41863–41873.
12. Kisselev A., Callard A., Goldberg A. Importance of the different proteolytic sites of the proteasome and the efficacy of inhibitors varies with the protein substrate // J. Biol. Chem. 2006. Vol. 281 (13). P. 8582–8590.
13. Landis-Piwowar K.R., Milacic V., Chen D. et al. The proteasome as a potential target for novel anticancer drugs and chemosensitizers // Drug Resist. Updat. 2006. Vol. 9. P. 263–273.
14. Lie C., Kiran M. Increased proteasome activity, ubiquitin-conjugating enzymes, and eEF1A translation factor detected in breast cancer tissue // Cancer Res. 2005. Vol. 65 (13). P. 5599–5606.
15. Li C., Li R., Grandis J.R., Johnson D.E. Bortezomib induces apoptosis via Bim and Bik up-regulation and synergizes with cisplatin in the killing of head and neck squamous cell carcinoma cells // Mol. Cancer Ther. 2008. Vol. 7 (6). P. 1647–1655.
16. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Randall R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193. P. 265–275.
17. La Rosa P., Pesiri V., Leclercq G. et al. Palmitoylation regulates 17-estradiol-induced estrogen receptor-degradation and transcriptional activity // Mol. Endocrinol. 2012. Vol. 26. P. 762–764.

18. Marx C., Yau C., Banwait S. et al. Proteasome-Regulated ERBB2 and Estrogen Receptor Pathways in Breast Cancer // *Mol. Pharmacol.* 2007. Vol. 71. P. 1525–1534.
19. Milano A., Iaffaioli R.V., Caponigro F. The proteasome: a worth while target for the treatment of solid tumours? // *Eur. J. Cancer.* 2007. Vol 43. P. 1125–1133.
20. Spirina L.V., Yunusova N.V., Kondakova I.V. et al. Association of growth factors, HIF-1 and NF-κB expression with proteasomes in endometrial cancer // *Mol. Biol. Repor.* 2012. Vol. 39 (9). P. 8655–86.
21. Spirina L.V., Kondakova I.V., Choynzonov E.L. et al. Expression of vascular endothelial growth factor and transcription factors HIF-1, NF-κB expression in squamous cell carcinoma of head and neck; association with proteasome and calpain activities // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2013. Vol. 139. P. 625–633.
22. Sharova N.P., Astakhova T.M., Karpova Y.D. et al. Changes in proteasome pool in human papillary thyroid carcinoma development // *Centr. Eur. J. Biol.* 2011. Vol. 6 (4). P. 486–496.
23. Xie Y. Structure, Assembly and Homeostatic Regulation of the 26S Proteasome // *J. Mol. Cell Biol.* 2010. Vol. 2 (6). P. 308–317.
24. Xu H., Ju D., Jarois T., Xie Y. Diminished feedback regulation of proteasome expression and resistance to proteasome inhibitors in breast cancer cells // *Breast Cancer Res. Treat.* 2008. Vol. 107. P. 267–274.

Поступила 21.06.13