АКАДЕМИЯ ЕСТЕСТВОЗНАНИЯ
«ACADEMY OF NATURAL HISTORY»

МЕЖДУНАРОДНЫЙ ЖУРНАЛ ПРИКЛАДНЫХ И ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

INTERNATIONAL JOURNAL OF APPLIED AND FUNDAMENTAL RESEARCH

Журнал основан в 2007 году
The journal is based in 2007
ISSN 1996-3955

Импакт фактор
РИНЦ – 1,387

№ 9 2015
Часть 2
Научный журнал
SCIENTIFIC JOURNAL

Электронная версия размещается на сайте www.rae.ru

The electronic version takes places on a site www.rae.ru

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР
д.м.н., профессор М.Ю. Ледванов

Ответственный секретарь
к.м.н. Н.Ю. Стукова

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ
Курзанов А.Н. (Россия)
Романцов М.Г. (Россия)
Дивоча В. (Украина)
Кочарян Г. (Украина)
Сломский В. (Польша)
Осик Ю. (Казахстан)
Алиев З.Г. (Азербайджан)

EDITOR
Mikhail Ledvanov (Russia)

Senior Director and Publisher
Natalia Stukova

EDITORIAL BOARD
Anatoly Kurzanov (Russia)
Mikhail Romantzov (Russia)
Valentina Divocha (Ukraine)
Garnik Kocharyan (Ukraine)
Wojciech Slomski (Poland)
Yuri Osik (Kazakhstan)
Zakir Aliev (Azerbaijan)

МОСКВА «АКАДЕМИЯ ЕСТЕСТВОЗНАНИЯ» **18+**

МЕЖДУНАРОДНЫЙ ЖУРНАЛ ПРИКЛАДНЫХ
И ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

INTERNATIONAL JOURNAL OF APPLIED
AND FUNDAMENTAL RESEARCH

Журнал включен в Реферативный журнал и Базы данных ВИНИТИ.
Сведения о журнале ежегодно публикуются в международной справочной системе по периодическим и продолжающимся изданиям «Ulrich's Periodicals directory» в целях информирования мировой научной общественности.

Журнал представлен в ведущих библиотеках страны и является рецензируемым.
Журнал представлен в НАУЧНОЙ ЭЛЕКТРОННОЙ БИБЛИОТЕКЕ (НЭБ) – головном исполнителе проекта по созданию Российского индекса научного цитирования (РИНЦ) и имеет импакт-фактор Российского индекса научного цитирования (ИФ РИНЦ).

Учредители – Российская Академия Естествознания,
Европейская Академия Естествознания

123557, Москва,
ул. Пресненский вал, 28

ISSN 1996-3955

Тел. редакции – 8-(499)-704-13-41
Факс (845-2)- 47-76-77

E-mail: edition@rae.ru

Зав. редакцией Т.В. Шнуровозова
Техническое редактирование и верстка Л.М. Митронова

Подписано в печать 26.08.2015

Адрес для корреспонденции: 105037, г. Москва, а/я 47

Формат 60x90 1/8
Типография
ИД «Академия Естествознания»
440000, г. Пенза,
ул. Лермонтова, 3

Усл. печ. л. 23,75.
Тираж 500 экз.
Заказ
МЖПиФИ 2015/9

© Академия Естествознания

УДК 618.146-006.6-08:615.28

ВЗАИМОСВЯЗЬ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКА ТЕПЛОВОГО ШОКА 90 КДА И РЕЦЕПТОРА ПРОГЕСТЕРОНА В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

[1,2,3]Кайгородова Е.В., [1]Богатюк М.В., [1,2,3]Завьялова М.В., [1,3]Перельмутер В.М.

[1]ФГБНУ «Томский научно-исследовательский институт онкологии», Томск,
e-mail: kaigorodova@oncology.tomsk.ru, bogatyuk.mari@mail.ru;
[2]Лаборатория трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины,
Томский Государственный университет, Томск;
[3]ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск

Проведен анализ взаимосвязи экспрессии рецептора прогестерона (PR) и белка теплового шока 90 кДа (Hsp90) в опухолевой ткани рака молочной железы (РМЖ) с верифицированным диагнозом инвазивной карциномы неспецифического типа. Для оценки функционального состояния Hsp90 с помощью иммуногистохимического метода учитывалось количество опухолевых клеток с ядерной и цитоплазматической локализацией шаперона в разном его фосфорилированном статусе. Дополнительно был введен коэффициент внутриклеточного распределения Hsp90 (Квр), который показал, что экспрессия PR связана с ядерной формой Hsp90 и его уровнем фосфорилирования в цитоплазме опухолевых клеток РМЖ.

Ключевые слова: рак молочной железы, рецептор прогестерона, Hsp90, статус фосфорилирования, внутриклеточная локализация

INTERACTION BITWEEN EXPRESSION HEAT SHOCK PROTEIIN 90 KDA AND PROGESTERON RECEPTOR IN TUMOR CELLS OF BREAST CANCER

[1,2,3]Kaigorodova E.V., [1]Bogatyuk M.V., [1,2,3]Zavyalova M.V., [1,3]Perelmuter V.M.

[1]Tomsk Cancer Research Institute, Tomsk,
e-mail: kaigorodova@oncology.tomsk.ru, bogatyuk.mari@mail.ru;
[2]Tomsk State University, Tomsk;
[3]Siberian State Medical University, Tomsk

We have done the analysis of the relationship between the expression of progesterone receptor (PR) and heat shock protein 90 kDa (Hsp90) in tumor tissue of breast cancer with verified diagnosis of invasive carcinoma nonspecific type. For the evaluation of the functional state of Hsp90 by using immunohistochemistry a number of tumor cells with nuclear and cytoplasm localization of chaperone in its different phosphorylated status was considered. Additionally the coefficient of intracellular distribution Hsp90 was introduced, which showed that the expression of PR is associated with the nuclear form Hsp90 and its level of phosphorylation in the cytoplasm of tumor cells of breast cancer.

Keywords: breast cancer, progesterone receptor, Hsp90, phosphorylation status, intracellular localization

Рак молочной железы (РМЖ) является самой часто встречаемой злокачественной опухолью среди женского населения. В настоящее время в качестве прогностических факторов определяющих неблагоприятный исход заболевания и тактику лечения РМЖ помимо клинико-морфологичесих признаков определяют молекулярные показатели [9]. К таким показателям относят рецепторы к стероидным гормонам, например, рецептор прогестерона (PR). Экспрессия данного рецептора является показанием для назначения гормональной терапии пациентов с РМЖ. В клинической практике встречаются случаи с резистентностью к гормонотерапии больных, поэтому гормонально-рецепторный статус опухоли оказывается не всегда достаточным показателем гормональной чувствительности РМЖ [5].

Известно, что PR связывается с белком теплового шока 90 кДа (Heat shock protein 90 kDa, Hsp90) [10]. Hsp90 является одним из представителей семейства специализированных биомолекул, которые выполняя функции молекулярных шаперонов, играют основную роль в правильной укладке клеточных белков. При опухолевой трансформации наблюдается увеличение экспрессии Hsp90 в 2–10 раз больше, чем в нормальных клетках, что обеспечивает резистентность к воздействию неблагоприятных факторов [1, 3, 4, 6].

На молекулярном уровне активность шаперонов контролируется статусом его фосфорилирования и внутриклеточной локализацией [2]. Hsp90 имеет большое количество сайтов фосфорилирования, модификация которых, регулирует шаперонную активность и специфичность к определенным субстратным белкам. Известно, что данный белок экспрессируется в ядре и цитоплазме. Его ядерная локализация рас-

сматривается как один из основных регуляторов транскрипции, а цитоплазматическая фракция выполняет шаперонную функцию более 200 белков. Например, Hsp90 участвует в функционировании различных протеинов, вовлеченных в неоплазию молочной железы (факторы транскрипции (HSF-1, HIF-1, p53), протеинкиназы (Akt, Cdk4, Cdk6), мутантные белки ($p53_{mut}$), рецепторы стероидных гормонов (PR, ER), семейства ErbB и т.д.) [6, 7, 10]. Однако, регуляторное влияние особенностей внутриклеточного распределения в разном фосфорилированном статусе Hsp90 на экспрессию данных белков не исследована.

Таким образом, **целью исследования** явилась оценка связи особенности внутриклеточной локализации и фосфорилированного статуса Hsp90 с уровнем экспрессии PR в опухолевых клетках РМЖ.

Материалы и методы исследования

Исследован биопсийный материал опухолевой ткани молочной железы 15 пациенток с верифицированным диагнозом инвазивной карциномы неспецифического типа (ФГБУ Томского НИИ онкологии СО РАМН г.Томска). Для определения экспрессии рецептора PR использовали моноклональные антитела фирмы «Dako» (Дания) (клон PgR636, RTU, мышиные), при определении Hsp90 и его фосфорилированной формы (p-Hsp90 (phospho S226-Hsp90)) использовали антитела фирмы «Abcam» (Hsp90, мышиные, клон AC88; pospho S228 Hsp90, поликлональные кроличьи). Оценка PR, Hsp90 и p-Hsp90 проводилась иммуногистохимическим методом (ИГХ) по проценту позитивно окрашенных клеток. Оценивалась особенность внутриклеточной локализации Hsp90 (Hsp90-Я – ядерная локализация, Hsp90-Ц – цитоплазматическая локализация). Для оценки функциональной особенности Hsp90 был введен коэффициент внутриклеточного распределения – Квр – отношение процентного количества опухолевых клеток с ядерной локализацией (Hsp90-Я,% + p-Hsp90-Я,%) к сумме клеток с цитоплазматической локализацией Hsp90 (Hsp90-Ц,% + p-Hsp90-Ц,%). Статистическая обработка данных выполнялась с использованием пакета программ Statistica 7.0. Для оценки достоверности различий между группами проводили попарный анализ с использованием критерия Манна-Уитни. Оценка зависимости между количественными переменными проводилась по коэффициенту корреляции Спирмена (r_s). Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

По результатам проведенного исследования 7 пациентов имели PR-позитивную экспрессию (40,0 (25,0–70,0)%) и соответственно 8 PR-негативную. Во всех 15 образцах опухолевого материала в инвазивном компоненте наблюдалась цитоплазматическая локализация шаперона (Hsp90-Ц 100 (98,3–100)%), из них у 1 больной была выявлена положительная экспрессия фосфорилированной формы белка в цитоплазме (p-Hsp90-Ц) 100% опухолевых клеток. В ядре была представлена экспрессия только нефосфорилированной формы Hsp90 (Hsp90-Я 12,0 (2,5–66,8)%, N = 7). При этом отрицательная ядерная ИГХ-реакция на p-Hsp90 не свидетельствует об его полном отсутствии, так как известно, что около 3% от общего клеточного пула Hsp90 присутствует в ядре и чувствительность ИГХ-метода может быть недостаточна для выявления малых количеств модифицированного белка. С другой стороны есть предположение, что ядерная модифицированная форма Hsp90 имеет другую посттрансляционную модификацию и поэтому выявляется только в цитоплазме [7].

При сравнении количества клеток экспрессирующих Hsp90 по локализации с учетом его фосфорилированного статуса в зависимости от наличия экспрессии PR не было выявлено статистических различий. Однако анализ введенного нами коэффициента внутриклеточного распределения Hsp90 (Квр) показал достоверное ($p = 0,034$) увеличение данного показателя в группе с PR-положительной экспрессией (0,98 (0,69–0,99) у.е.) по сравнению с PR-негативной группой (0,03 (0,01–0,08) у.е.) (рис. 1).

Данное исследование выявило наличие положительной корреляционной связи между Квр и уровнем экспрессии PR ($r_s = 0,788$, $p = 0,035$) (рис. 2). Так как экспрессия нефосфорилированной формы Hsp90 в цитоплазме наблюдалась практически во всех опухолевых клетках, то данная взаимосвязь Квр и экспрессии PR обусловлена отношением Hsp90-Я и p-Hsp90-Ц. Зависимость усиления экспрессии рецептора PR с Квр связана со снижением фосфорилированных форм Hsp90 в цитоплазме, вероятно, вследствие активности протеинкиназ/дефосфатаз при увеличении процесса транслокализации Hsp90 из цитоплазмы в ядро. Согласно литературным данным в ядре Hsp90 освобождает участки генома от нуклеосом, изменяет структуру гетерохроматина, способствует активированию РНК-полимеразы II и факторов транскрипции, что стимулирует транскрипцию различных генов [7]. Также известно, что Hsp90 имеет различные сайты фосфорилирования (Thr^{90}, Thr^{115}, Thr^{425}, Thr^{603} и др.) [8]. В зависимости от модификации того или иного сайта в молекуле Hsp90 меняется не только его шаперонная активность (АТФ-азный цикл), но и специфичность к белкам-субстратам. Например, фосфорилирование Hsp90 Thr^{22} ослабляет его взаимодействие с Aha1 (активатор

АТФ-азы Hsp90) и снижает шаперонную активность, фосфорилирование по Tyr[309] приводит к увеличению функциональной активности eNOS (эндотелиальная NO-синтаза) [8]. По результатам нашего исследования следует, что увеличение Квр связано со снижением уровня цитоплазматического фосфопротеина Hsp90 (Ser[226]), который вероятнее всего является либо функционально неактивной формой, либо специфично угнетает шаперонную активность по отношению к PR.

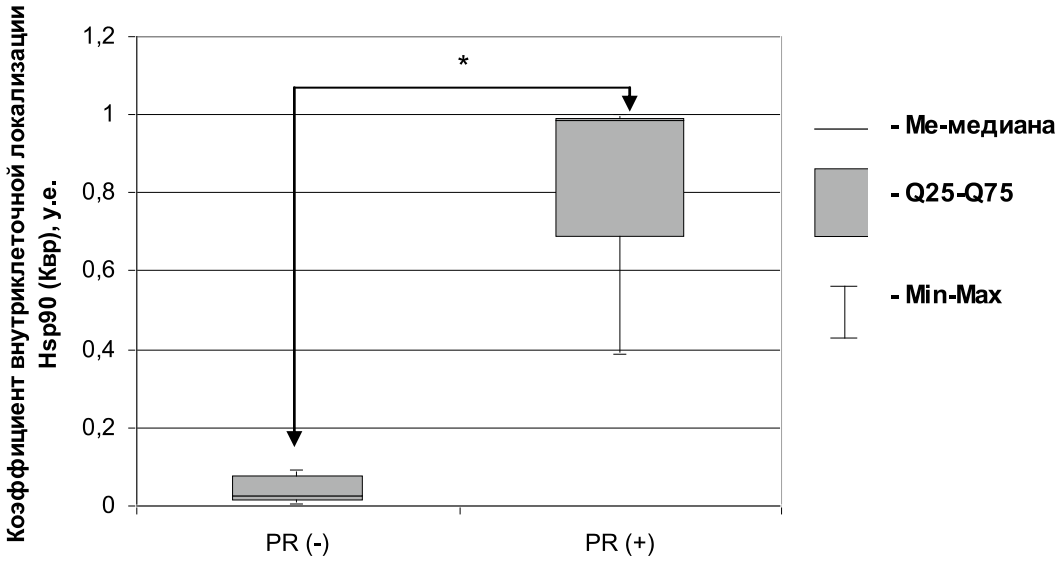

*Рис. 1. Коэффициент внутриклеточного распределения Hsp90 (Квр) в зависимости от отсутствия/наличия окраски ИГХ-реакции рецептора прогестерона (PR (-)/PR (+)) в опухолевых клетках РМЖ. Примечание: * – достоверность различий p < 0,05*

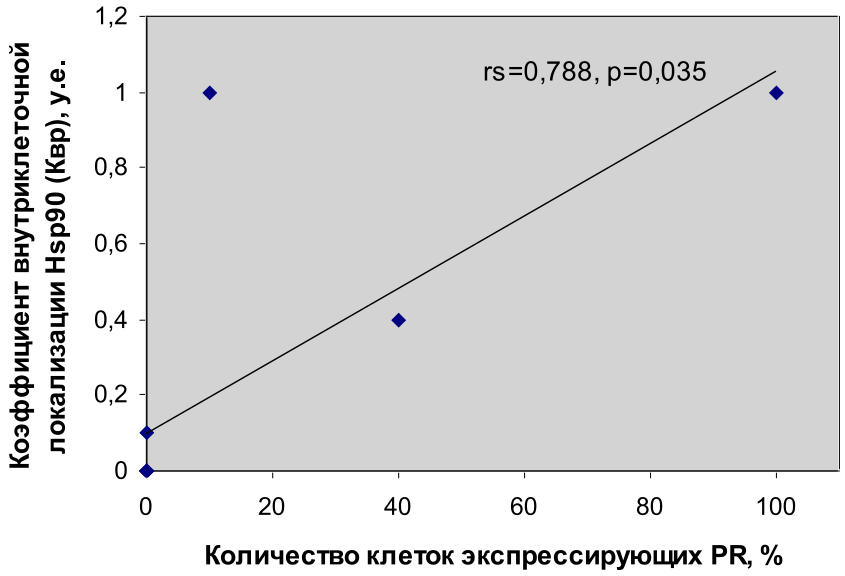

Рис. 2. Корреляционная зависимость коэффициента внутриклеточного распределения Hsp90 (Квр) с количеством опухолевых клеток РМЖ экспрессирующих PR

Выводы

В опухолевых клетках РМЖ Hsp90 имеет низкий статус фосфорилирования и в основном представлен в цитоплазме. Экспрессия PR в опухолевых клетках РМЖ связана положительной корреляционной связью с соотношением в клетке ядерной нефосфорилированной формой и цитоплазматической фракцией p-Hsp90. Можно предположить, что воздействуя на механизм внутриклеточного распределения и фосфорилированный статус Hsp90 в опухолевых клетках РМЖ, будет изменяться экспрессия PR и как следствие чувствительность к гормонотерапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента № МД-168.2014.7 и РФФФ 15-34-20864 мол_а_вед на оборудовании Томского регионального центра коллективного пользования, приобретенного при поддержке Минобрнауки России по Соглашению №14.594.21.000.

Список литературы

1. Кайгородова Е.В. Белки теплового шока и митоген-активированные протеинкиназы JNK, p38: роль в адаптации и дизрегуляции клетки при стрессиндуцированном апоптозе / Е.В. Кайгородова, Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий // Молекулярная медицина. – 2012. – № 1. – С. 3–9.

2. Кайгородова Е.В. Новые показатели функционального состояния Hsp27 в опухолевых клетках рака молочной железы при различных вариантах Her2/neu-статуса / Е.В. Кайгородова, М.В. Богатюк, М.В. Завьялова, Н.А. Тарабановская, Е.И. Симолина, Е.М. Слонимская, Е.Л. Чойнзонов, В.М. Перельмутер // Сибирский онкологический журнал. – 2015. – № 1. – С. 38–44.

3. Кайгородова Е.В. Роль белка теплового шока 90 в регуляции апоптоза опухолевых клеток / Е.В. Кайгородова, Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий, М.В. Белкина, А.Н. Марошкина // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2010. – Т. 150, № 10. – С. 424–426.

4. Кайгородова Е.В., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В. Апоптоз и белки теплового шока. Томск: Изд-во «Печатная мануфактура», 2012. − 180 с.

5. Díaz Flaqué M.C. Progesterone receptor assembly of a transcriptional complex along with activator protein 1, signal transducer and activator of transcription 3 and ErbB-2 governs breast cancer growth and predicts response to endocrine therapy / M.C. Díaz Flaqué, N.M. Galigniana, W Béguelin, R. Vicario, C.J. Proietti, R. Russo, M.A. Rivas, M. Tkach, P. Guzmán, J.C. Roa, E. Maronna, V. Pineda, S. Muñoz, M. Mercogliano, E.H. Charreau, P. Yankilevich, R. Schillaci, P.V. Elizalde // Breast Cancer Res. – 2013. – Vol. 15(6). – P. 118.

6. Kaigorodova E.V., Bogatyuk M.V. Heat Shock Proteins as Prognostic Markers of Cancer // Current Cancer Drug Targets. – 2014. – Vol. 14, №8. – P. 713–726.

7. Khurana N., Bhattacharyya S. Hsp90, the concertmaster: tuning transcription // Front Oncol. – 2015. – № 5. – P. 100.

8. Lu X.A. The regulatory mechanism of a client kinase controlling its own release from Hsp90 chaperone machinery through phosphorylation / X.A. Lu, X. Wang, W. Zhuo, L. Jia, Y. Jiang, Y. Fu, Y. Luo // Biochem J. – 2014. – № 457(1). – P. 171–83.

9. Sestak I., Cuzick J. Markers for the identification of late breast cancer recurrence // Breast Cancer Res. – 2015. – Vol. 17:10.

10. Zagouri F. Hsp90 in the continuum of breast ductal carcinogenesis: evaluation in precursors, preinvasive and ductal carcinoma lesions / F. Zagouri, T.N. Sergentanis, A. Nonni, C.A. Papadimitriou, N.V. Michalopoulos, P. Domeyer, G. Theodoropoulos, A. Lazaris, E. Patsouris, E. Zogafos, A. Pazaiti, G.C. Zografos // BMC Cancer. – 2010. – Vol. 10:353.