

УДК 618.19-006.6-033.2:577.21

## ОЦЕНКА ВЗАИМОСВЯЗИ УРОВНЯ БЕЛКОВ КЛЕТОЧНОЙ ПОДВИЖНОСТИ С ПРОЦЕССАМИ ПРОТЕОЛИЗА И ЛИМФОГЕННОГО МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

© 2021 г. Е. Е. Середина<sup>1,\*</sup>, Е. С. Колегова<sup>1</sup>, Г. В. Какурина<sup>1</sup>, Е. А. Сиденко<sup>1</sup>,  
Д. А. Коршунов<sup>1</sup>, И. В. Кондакова<sup>1</sup>

Представлено академиком РАН Е.Л. Чойнозовым

Поступило 27.02.2021 г.

После доработки 29.03.2021 г.

Принято к публикации 31.03.2021 г.

Биологическая агрессивность опухоли определяется способностью опухолевых клеток к инвазии и метастазированию, что является следствием приобретения ими целого ряда фенотипических характеристик. Во время миграции клеток происходит ремоделирование актинового цитоскелета, которое осуществляется различными группами актин-связывающих белков, в регуляции которых важную роль играют протеасомы и кальпаины. Поэтому, изучение взаимосвязи белков, ассоциированных с клеточной подвижностью с процессами лимфогенного метастазирования, а также оценка регулирующей роли внутриклеточных протеаз в этих процессах чрезвычайно актуально для фундаментальной онкологии. В проведенном исследовании продемонстрированы ассоциации актин-связывающих белков с активностью протеасом и кальпаинов, характерные для опухолей и метастазов молочной железы, предложена возможная схема взаимосвязи внутриклеточных систем с актин-связывающими белками. Полученные результаты расширяют фундаментальные представления о процессах опухолевой прогрессии, а также могут быть использованы при поиске белков – мишеней для терапевтического воздействия при молекулярно-направленной терапии рака.

*Ключевые слова:* рак молочной железы, актин-связывающие белки, протеасомы, кальпаины, лимфогенные метастазы

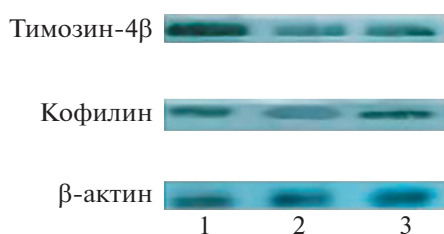
DOI: 10.31857/S2686738921040223

Процесс метастазирования злокачественных опухолей связан с приобретением клетками подвижности, которая обеспечивается изменением экспрессионного профиля различных актин-связывающих белков и  $\beta$ -катенина. Во время миграции клеток происходит ремоделирование актинового цитоскелета, которое осуществляется различными группами актин-связывающих белков: мономер связывающие белки (тимозин-4 $\beta$ ); филамент – деполимеризующие белки (кофилин); белки, разрывающие актиновые филаменты и формирующие два фрагмента (гельзолин); поперечносвязывающие белки, участвующие в формировании пучков филаментов, их ветвлении и формировании трехмерных структур (белки Agr2/3 комплекса) [1]. В этих процессах важную роль отводят и  $\beta$ -катенину, который в клетке при-

сутствует в составе катенин-кадгеринных комплексов, обеспечивая адгезию и снижая миграционную активность клеток. С другой стороны,  $\beta$ -катенин является сигнальной молекулой в Wnt/ $\beta$ -катенин сигнализации, участвует в активации генной транскрипции посредством трансактивации TCF/LEF транскрипционных факторов, что приводит к повышению миграции, снижению адгезии и повышению пролиферации клеток [2]. По данным литературы, при анализе экспрессии генов, кодирующих актин-связывающие белки, было продемонстрировано их участие при опухолевой прогрессии и на этапах метастазирования [3]. Важная роль в регуляции активности локомоторных белков отводится протеасомам и кальпаинам, которые постоянно и с высокой скоростью утилизируют белки, выполнившие свою функцию, к числу которых относятся локомоторные белки [4, 5]. Протеасомы в клетке представлены мультикаталитическими мультисубединичными комплексами и осуществляют протеолиз цитозольных, ядерных белков, превращение неактивных белков – предшественников в актив-

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, Россия

\*e-mail: schaschovae@oncology.tomsk.ru



**Рис. 1.** Результаты Вестерн-блоттинг анализа содержания белков тимозин-4 $\beta$  и кофилина в тканях молочной железы: 1 – в неизменной ткани; 2 – в опухолевой ткани; 3 – в ткани метастатических регионарных лимфоузлов.

ные, участвуют в образовании регуляторных пептидов, презентации комплекса гистосовместимости I типа, регуляции транскрипции генов [6, 7]. Протеасомы проявляют каспазаподобную (КПА), трипсинподобную (ТПА) и химотрипсинподобную (ХПА) активность [8]. При обширном лимфогенном метастазировании рака молочной железы (РМЖ) наблюдается значительное угнетение активности протеасом, которое может считаться неблагоприятным прогностическим признаком [9–11]. Другая внутриклеточная протеолитическая система – кальпаиновая, представлена кальций-зависимыми цистеиновыми протеазами, которые осуществляют частичный протеолиз и часто поставляют субстрат для дальнейшей деградации белка протеасомами. Кальпаины могут выполнять посттрансляционную модификацию белков, увеличивая функциональное разнообразие белков – мишеней. Показано, что протеолитическая деградация характерна для  $\beta$ -катенина, кофилина, гельзолина и Atp2/3 комплекса [12, 13]. Протеолитическая регуляция актин-связывающих белков исследована недостаточно, несмотря на то, что этот процесс может быть одним из основных в реализации метастазирования злокачественных опухолей.

Целью настоящего исследования явилась оценка белков, ассоциированных с клеточной подвижностью при лимфогенном метастазировании РМЖ и изучение их взаимосвязи с активностью протеасом и кальпаинов.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Всего в исследование было включено 73 пациентки с первично операбельным инвазивным РМЖ (T<sub>1-3</sub>N<sub>1-2</sub>M<sub>0</sub>), комбинированное лечение которых было начато с хирургического этапа, включало проведение оперативного вмешательства, выполняемого в объеме радикальной мастэктомии или органосохранной расширенной операции. Возраст пациенток, вошедших в исследование, варьировал от 28 до 75 лет (средний возраст больных 56 ± 11 лет). У всех пациенток РМЖ

диагноз был верифицирован морфологически. В представленной выборке у 71% пациенток было обнаружено от 1 до 3 метастатически-измененных регионарных лимфоузла, у 29% пациенток было обнаружено 4 и более метастатически-измененных регионарных лимфоузла. Материалом для исследования служили образцы неизменной, опухолевой ткани, а также ткань лимфогенных метастазов, полученные при выполнении радикального оперативного вмешательства. Под неизменной тканью подразумевали визуально неизмененную ткань молочной железы, взятую на расстоянии 1–3 см от границы опухоли. Опухолевая ткань и ткань лимфоузла проходили обязательную морфологическую верификацию. Содержание актин-связывающих белков – кофилина и тимозина – оценивалось методом Вестерн-блоттинг в осветленном гомогенате тканей. При этом проводилась стандартизация значений изучаемых белков на содержание  $\beta$ -актина. Результаты выражали в процентах от содержания изучаемых белков в неизменной ткани (рис. 1). Содержание белков p45-Ser- $\beta$ -катенин, Atp3 и гельзолина оценивали методом проточной цитофлуориметрии в цитокератин 18-позитивных клетках. При этом оценивался процент клеток, экспрессирующих изучаемые показатели, по отношению ко всем цитокератин 18-позитивным клеткам.

Активность протеасом и кальпаинов в тканях РМЖ определяли в осветленных гомогенатах тканей по гидролизу соответствующих флуорогенных олигопептидов Suc-LLVY-AMC и Cbz-LLG-AMC (Sigma, США). Для оценки активности примесных протеаз применяли специфический ингибитор протеасом – MG132 (Sigma, США) и ингибитор кальпаинов – MG101 (Sigma, США). Активность протеасом и кальпаинов выражали в единицах активности на 1 мг белка (10<sup>3</sup> Ед/мг белка).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении содержания актин-связывающих белков в тканях пациенток РМЖ было показано, что уровень тимозина и кофилина достоверно выше в метастазах по сравнению с тканью первичной опухоли молочной железы. Содержание актин-разрывающего белка гельзолина (который функционально схож с кофилином), уровень белка Atp3, участвующего в связывании филаментов и входящего в состав Atp2/3 комплекса, а также содержание фосфорилированной по серину-45 фракции белка  $\beta$ -катенина не изменялось в метастазах по сравнению с первичной опухолью (табл. 1).

Таким образом, продемонстрировано различие в уровне мономера связывающего белка тимозина-4 $\beta$  и филамент-деполимеризующего белка кофилина между тканью первичной опухоли и

**Таблица 1.** Процентное содержание актин-связывающих белков и p45-Ser  $\beta$ -катенина в ткани первичной опухоли и метастазах в регионарные лимфатические узлы у больных раком молочной железы

Исследуемый показатель, (%)	Первичная опухоль	Метастазы в регионарные лимфоузлы	<i>p</i>
Тимозин-4 $\beta$	19.0 [12.0; 23.0]	56.0 [32.5; 94.5]	<i>p</i> = 0.001
Кофилин	19.0 [14.0; 23.0]	152.0 [55.0; 237.0]	<i>p</i> = 0.0009
p45-Ser $\beta$ -катенин	74.5 [29.0; 90.0]	77.0 [69.0; 93.0]	<i>p</i> > 0.05
Агр3	34.0 [27.0; 64.0]	47.0 [43.0; 56.0]	<i>p</i> > 0.05
Гельзолин	58.0 [33.0; 77.0]	72.0 [56.0; 77.0]	<i>p</i> > 0.05

**Таблица 2.** Изменение активности протеасомной и кальпаиновой внутриклеточных протеолитических систем в неизменной, опухолевой ткани и ткани метастатически измененных регионарных лимфатических узлов при раке молочной железы

Активность внутриклеточных протеаз	Неизменная ткань	Опухолевая ткань	Метастазы в регионарные лимфоузлы
ХПА	16.33 [8.22; 35.75]	39.66* [19.16; 80.90]	59.52*,** [29.39; 148.69]
КПА	17.2 [9.68; 40.01]	46.0* [19.57; 146.63]	43.63* [16.54; 110.95]
АК	34.95 [20.09; 128.57]	66.08* [32.30; 158.70]	59.40 [22.10; 185.90]

Примечание: \* – значимость различий с группой неизменной ткани, *p* < 0.01; \*\* – значимость различий с группой опухолевая ткань, *p* < 0.05.

лимфогенными метастазами рака молочной железы.

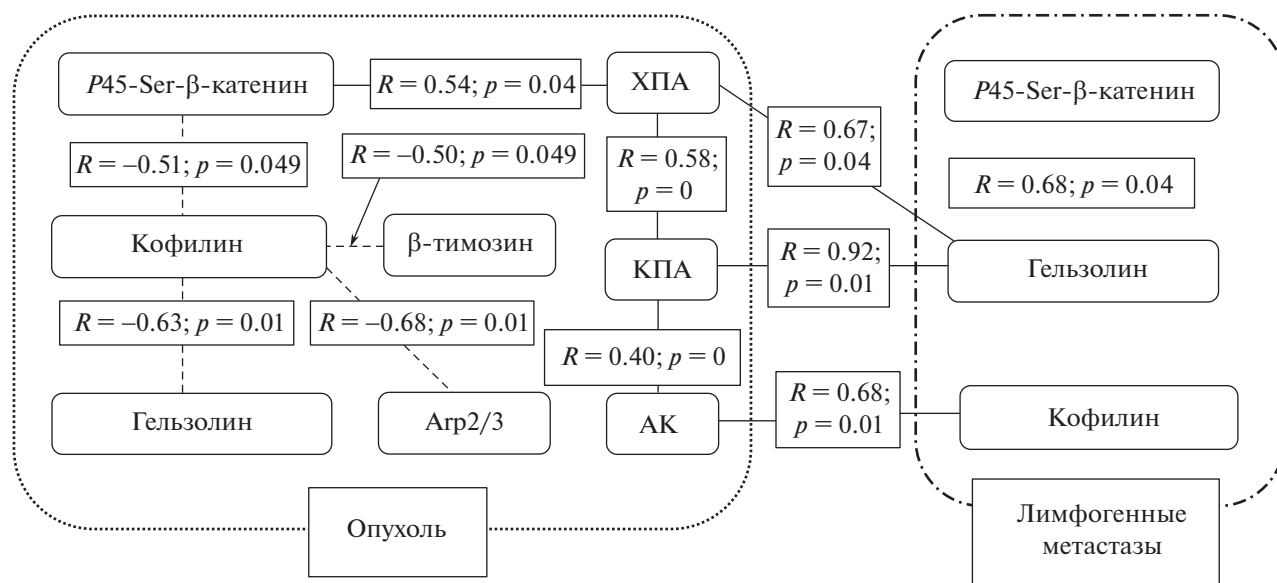
В настоящее время различные аспекты влияния протеасом и кальпаинов на приобретение злокачественными клетками способности к метастазированию не в полной мере освещены в литературе, и, несомненно, нуждаются в дальнейшем изучении. Поэтому следующим этапом проведенного исследования явилось изучение активности внутриклеточных протеолитических систем в тканях РМЖ и их дальнейшее сопоставление с содержанием актин-связывающих белков в опухолевой ткани и лимфогенных метастазах при раке молочной железы.

При изучении активности протеасом и кальпаинов в тканях больных РМЖ выявлено усиление процессов внутриклеточного протеолиза в опухоли и ткани лимфогенных метастазов по сравнению с неизменными тканями. В опухоли продемонстрировано статистически значимое увеличение ХПА в 2.4 раза, КПА в 2.7 и активности кальпаинов (АК) в 1.9 раза соответственно, по сравнению с неизменной тканью. В ткани метастатически измененных регионарных лимфоузлов наблюдалось увеличение ХПА в 3.6 раза и КПА в 2.5 раза по сравнению с неизменной тканью. Кроме того, для ХПА было зарегистрировано статистически значимое увеличение в ряду: “неизменная ткань – опухоль – лимфогенные метастазы” (*p* = 0.04). КПА протеасом и активность кальпаинов в опухоли были сопоставимы с активностью в лимфоузлах (табл. 2).

Далее было проведено сопоставление активности внутриклеточных протеаз с содержанием актин-связывающих белков в опухолевой ткани и лимфогенных метастазах при раке молочной железы (рис. 2).

Выполненный корреляционный анализ показал, что в ткани рака молочной железы наблюдается отрицательная корреляционная зависимость между содержанием кофилина и другими актин-связывающими белками (тимозин-4 $\beta$ , гельзолин, Агр3 и p45-Ser  $\beta$ -катенин), а также прямые взаимосвязи между p45-Ser- $\beta$ -катенином, который регулирует адгезивные и миграционные способности клеток, и ХПА протеасом. На основе результатов корреляционного анализа нами предложена возможная схема взаимосвязи протеасомной, кальпаиновой внутриклеточных систем с актин-связывающими белками. Для ткани метастатических лимфоузлов выявлена взаимосвязь Р45-Ser- $\beta$ -катенина и гельзолина с ХПА и КПА протеасом опухолевой ткани, тогда как содержание кофилина в метастазах прямо коррелировало с АК в опухоли, которые являются протеазамодуляторами и часто поставляют субстрат для дальнейшей деградации белка протеасомами (рис. 2).

Вероятно, для опухолей молочной железы характерен протеолиз p45-Ser- $\beta$ -катенина, скорее всего, конъюгированного с полиубиквитином, 26S протеасомой либо гибридной формой протеасом, что согласуется с представлениями о неканоническом пути регуляции стабильности молекул  $\beta$ -катенина через убиквитин-протеасомную



**Рис. 2.** Корреляционные взаимосвязи между актин-связывающими белками, фракциями β-катенина, активностью протеасом и кальпаинов.

Примечание: ХПА – химотрипсинподобная активность протеасом; КПА – каспазаподобная активность протеасом; АК – активность кальпаинов; R – коэффициент корреляции Спирмена; – обратная корреляционная взаимосвязь; – прямая корреляционная взаимосвязь. p – уровень статистической значимости показателя.

систему [14]. А прямая корреляционная зависимость активности кальпаина в опухоли с содержанием деполимеризующего белка кофилина в метастазах может быть связана со способностью кальпаинов расщеплять адгезионные межклеточные контакты, которые способствуют выходу клеток в регионарные лимфоузлы [15]. Полученные результаты расширяют фундаментальные представления о процессах метастазирования злокачественных опухолей.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Все авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа была проведена в соответствии с принципами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации “Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека” с поправками 2000 г. Кроме того, было получено информированное согласие каждого пациента, включенного в исследование, а также разрешение этического комитета НИИ онкологии ТНИМЦ.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *dos Remedios C.G., Chhabra D., Kekic M., et al.* Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments (Review) // *Physiol. Rev.* 2003. V. 83. № 2. P. 433–473.
2. *Guo X., Wang X., Wang Z., et al.* Site-specific proteasome phosphorylation controls cell proliferation and tumorigenesis // *Nat. Cell. Biol.* 2016. V. 18. № (2). P. 202–212.
3. *Какурина Г.В., Кондакова И.В., Спирина Л.В., и др.* Экспрессия генов, кодирующих белки клеточной подвижности, в развитии плоскоклеточного рака головы и шеи // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2018. Т. 166. № 8. С. 209–212.
4. *Islam S.M.-A., Patel R., Bommarreddy R.R.* The modulation of actin dynamics via atypical protein kinase-C activated cofilin regulates metastasis of colorectal cancer cells // *Cell. Adh. Migr.* 2018. № 10. P. 1–15.
5. *Del Carmen Lafita-Navarro M., Conacci-Sorrell M.* Identification of calpain-activated protein functions // *Methods Mol. Biol.* 2019. V. 1915. P. 149–160.
6. *Степанова А.А., Люпина Ю.В., Шарова Н.П. и др.* Нативная структура иммунных протеасом печени крыс // *Доклады Академии наук.* 2016. Т. 468. № 3. С. 339–341.
7. *Collins G.A., Goldberg A.L.* The logic of the 26S proteasome // *Cell.* 2017. V. 169. № 5. P. 792–806.
8. *Jung T., Grune T.* Structure of the proteasome // *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2012. V. 109. P. 1–39.
9. *Шашова Е.Е., Астахова Т.М., Плеханова А.С., и др.* Изменение химотрипсинподобной активности протеасом в развитии карцином молочной и щитовидной желез человека // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2013. № 8. С. 209–211.
10. *Шашова Е.Е., Кондакова И.В., Слонимская Е.М., и др.* Изменение химотрипсинподобной и каспазаподобной активностей протеасом в зависимости

- от степени распространенности рака молочной железы // Сибирский онкологический журнал. 2013. № 5. С. 45–49.
11. *Шашова Е.Е., Колегова Е.С., Завьялов А.А., и др.* Изменение активности протеасом и кальпаинов при метастазировании рака легкого и рака молочной железы человека // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2017. Т. 163. № 4. С. 486–489.
  12. *Shortrede J.E., Uzair I.D., Neira F.J., et al.* Paxillin, a novel controller in the signaling of estrogen to FAK/N-WASP/Arp2/3 complex in breast cancer cells // *Mol Cell Endocrinol.* 2016. V. 430. P. 56–67.
  13. *Molinie N., Gautreau A.* The Arp2/3 regulatory system and its deregulation in cancer // *Physiological Reviews.* 2018. V. 98. № 1. P. 215–238.
  14. *Shang S., Hua F., Hu Z.W.* The regulation of  $\beta$ -catenin activity and function in cancer: therapeutic opportunities // *Oncotarget.* 2017. V. 8. № 20. P. 33972–33989.
  15. *Carragher N.O.* Assaying calpain activity // *Methods Mol. Biol.* 2007. V. 370. P. 109–120.

## RELATIONSHIP ESTIMATION OF CELL MOBILITY PROTEINS LEVEL WITH PROCESSES OF PROTEOLYSIS AND LYMPHOGENIC METASTASIS IN BREAST CANCER

**E. E. Sereda<sup>a,#</sup>, E. S. Kolegova<sup>a</sup>, G. V. Kakurina<sup>a</sup>, E. A. Sidenko<sup>a</sup>,  
D. A. Korshunov<sup>a</sup>, and I. V. Kondakova<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> *Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation*

<sup>#</sup>*e-mail: schaschovaee@oncology.tomsk.ru*

Presented by Academician of the RAS E.L. Choynozov

The biological aggressiveness of a tumor is determined by the ability of tumor cells to invade and metastasize which is a consequence of their acquisition of a number of phenotypic characteristics. Remodeling of the actin cytoskeleton occurs during cell migration which is carried out by various groups of actin binding proteins in the regulation of which proteasomes and calpains play an important role. Therefore the study of the relationship of proteins associated with cell motility with the processes of lymphogenous metastasis as well as the assessment of the regulatory role of intracellular proteases in these processes is extremely important for fundamental oncology. This study demonstrates the associations of actin binding proteins with the activity of proteasomes and calpain, which are specific for tumors and metastases of the mammary gland. We proposed a possible scheme of the relationship of intracellular systems with actin binding proteins. The results obtained expand the fundamental understanding of the processes of tumor progression and can also be used in the search for proteins-targets for therapeutic action in molecular targeted cancer therapy.

*Keywords:* breast cancer, actin binding proteins, proteasomes, calpains, lymphogenous metastases