

DOI: 10.21294/1814-4861-2017-16-3-33-39

УДК: 618.19-006.6:577.112

Для цитирования: Шашова Е.Е., Дорошенко А.В., Бондарь Л.Н., Слонимская Е.М., Кондакова И.В. Протеасомная и кальпаиновая протеолитические системы при различных молекулярных подтипах рака молочной железы. Сибирский онкологический журнал. 2017; 16 (3): 33–39. DOI: 10.21294/1814-4861-2017-16-3-33-39.

For citation: Shashova E.E., Doroshenko A.V., Bondar L.N., Slonimskaya E.M., Kondakova I.V. Proteasomal and calpain proteolysis systems in different molecular subtypes of breast cancer. Siberian Journal of Oncology. 2017; 16 (3): 33–39. DOI: 10.21294/1814-4861-2017-16-3-33-39.

ПРОТЕАСОМНАЯ И КАЛЬПАИНОВАЯ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ПОДТИПАХ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Е.Е. Шашова¹, А.В. Дорошенко¹, Л.Н. Бондарь¹, Е.М. Слонимская^{1,2},
И.В. Кондакова¹

Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск¹

634009, г. Томск, пер. Кооперативный, 5. E-mail: SchaschovaEE@oncology.tomsk.ru¹

ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Томск²
634050, г. Томск, Московский тракт, 2²

Аннотация

Изучены показатели кальпаиновой и протеасомной систем при различных молекулярных подтипах рака опухолей молочной железы (РМЖ). В исследование был включен операционный материал от 147 больных раком молочной железы T₁₋₃N₀₋₂M₀ стадии, не получавших неоадьювантной терапии. Выявлены изменения химотрипсинподобной активности протеасом, а также различные корреляционные взаимосвязи между показателями протеасомной и кальпаиновой систем, характерные для различных молекулярных подтипов РМЖ. Не обнаружено ярко выраженных, специфических для различных молекулярных подтипов РМЖ изменений в активности кальпаинов и в содержании субъединиц протеасом. Полученные результаты показывают, что работа протеасомной системы претерпевает изменения в зависимости от экспрессии рецепторов опухолевыми клетками, и этот аспект нуждается в дальнейшем исследовании.

Ключевые слова: молекулярные подтипы рака молочной железы, активность протеасом, активность кальпаинов, субъединичный состав протеасом.

При диагностике рака молочной железы (РМЖ) в настоящее время используются клеточные маркеры, которые характеризуют определенный молекулярный подтип опухоли, что важно для индивидуализации лекарственного лечения и прогнозирования исхода заболевания. К таким маркерам относят: экспрессию рецепторов эстрогенов, прогестерона, HER-2/neu и маркер пролиферативной активности Ki67.

Одним из основных путей регуляции уровня и активности рецепторов, компонентов сигнальных путей, факторов транскрипции, участвующих в формировании РМЖ, является протеолиз, опосредуемый убиквитин-протеасомной и кальпаиновой системами. Протеасома представляет собой мультисубъединичный комплекс, состоит из каталитической сердцевинки (конститутивные альфа- и бета-субъединицы), к которой присоединен определенный регуляторный комплекс, и обладает тремя основными протеоли-

тическими активностями: химотрипсинподобной (ХПА), трипсинподобной и каспазаподобной (КПА) [1]. Если к коровой части протеасом присоединяется регулятор PA28, то формируется 20S протеасома, в которой происходит расщепление коротких полипептидов. Если в роли активаторной частицы выступает 19S регуляторный комплекс, то формируется 26S протеасома, которая принимает участие в деградации основной массы клеточных белков. Также может произойти формирование модифицированных форм протеасом, благодаря замене конститутивных субъединиц на иммунные, или путем присоединения различных регуляторов, что может сопровождаться изменением активности протеасом [2].

Кальпаины представляют собой кальцийзависимые цитозольные цистеиновые протеиназы, которые не деградируют белок полностью, а лишь изменяют его структуру и выполняют частичный протеолиз [3]. Субстратами для кальпаиновой си-

стемы являются некоторые онкобелки, продукты онкосупрессоров, актин-связывающие белки [4].

В ряде исследований продемонстрировано участие убиквитин-протеасомной и кальпаиновой систем в развитии опухолей различных локализаций, причем эти изменения разнонаправленные. В частности, развитие рака эндометрия связано с повышением ХПА активности протеасом, увеличением содержания LMP2, LMP7, PA28 субъединиц и снижением экспрессии $\alpha 1a2a3a5a6a7$ субъединиц протеасом [5]. При раке щитовидной железы с метастазами в регионарные лимфоузлы, а также при раке толстой кишки с лимфогенными и гематогенными метастазами выявлено увеличение ХПА активности протеасом [6, 7]. В то же время при плоскоклеточном раке головы и шеи высокая ХПА активность протеасом является благоприятным прогностическим признаком и ассоциируется с более высокими показателями общей 2-летней выживаемости [8]. У больных эпителиальным раком яичников III стадии со сниженной активностью внутриклеточных протеаз обнаружено прогрессирование заболевания после лечения и достигнутой стабилизации [9]. У больных раком почки отмечается изменение активности кальпаинов и протеасом в опухоли после лечения эверолимусом и ингибиторами тирозинкиназ [10, 11]. При РМЖ с обширными лимфогенными метастазами наблюдается значительное угнетение активности протеасом, что в дальнейшем может рассматриваться в качестве неблагоприятного прогностического признака [12]. При трижды негативном РМЖ продемонстрировано, что высокое содержание кальпаина-2 связано с более низкими показателями общей выживаемости [13].

Для рака молочной железы показано, что взаимодействие эстрогеновых рецепторов с сигнальными путями, реализуемыми через рецепторы эпидермального фактора роста (EGFR), играет существенную роль в развитии резистентности опухоли к эндокринному воздействию [14, 15]. В литературе имеются данные о том, что протеасомы принимают участие в регуляции доступности эстрогеновых рецепторов и, кроме того, в разрушении рецепторов прогестерона, в снижении экспрессии рецепторов EGFR и HER-2/neu, дегградации рецепторов инсулиноподобных факторов роста гормонов, а также ряда транскрипционных факторов [16–19]. В то же время была показана связь наличия эстрогеновых рецепторов с изменением химотрипсинподобной активности протеасом при РМЖ [20]. Эти результаты указывают на то, что при РМЖ изменение показателей протеасомной системы может быть обусловлено наличием или отсутствием рецепторов эстрогенов (РЭ), прогестерона (РП), HER-2/neu.

Целью исследования явилось изучение показателей кальпаиновой и протеасомной систем при различных вариантах рака молочной железы.

Материал и методы

Всего в исследование было включено 147 пациенток с РМЖ T₁₋₃N₀₋₂M₀ стадии, в возрасте от 28 до 70 лет (средний возраст – 54,7 ± 9,9 года). У 67 пациенток диагностирован люминальный А РМЖ, у 54 – люминальный В, у 19 пациенток – трижды негативный, у 7 – HER-2 позитивный рак молочной железы. Все пациентки получали комбинированное лечение: радикальная операция с адьювантной химио-, гормоно- или лучевой терапией по показаниям. Неoadьювантное лечение не проводилось. Материалом для исследования явилась опухолевая и условно не измененная ткань (взятая на расстоянии не менее 1 см от границы опухоли) молочной железы, полученная после оперативного вмешательства.

Работа проведена с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основами 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 и кальпаиновой систем проводилась путем определения общей активности кальпаинов, химотрипсиноподобной и каспазаподобной активностей протеасом флуориметрическим методом. На первом этапе для определения активности протеасом из изучаемых тканей получали осветленные гомогенаты. Гомогенат центрифугировали 60 мин при 10 000g и 4°C.

Определение активности протеасом и кальпаинов. Химотрипсиноподобную активность протеасом (ХПА), каспазаподобную активность протеасом (КПА) и активность кальпаинов (АК) определяли в осветленных гомогенатах опухолевой ткани по гидролизу специфичных флуорогенных олигопептидов. Для определения химотрипсинподобной активности протеасом в качестве олигопептида использовали Suc-LLVY-AMC (Sigma, США), который утилизируется химотрипсинподобными центрами протеасом [21]. Для оценки каспазаподобной 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. Активность кальпаинов определяли по методу S. Sandmann в модификации [22]. Для определения активности кальпаинов в качестве субстрата использовали Suc-LLVY-AMC (Sigma, США). Реакцию проводили при 25°C в течение 30 мин в присутствии или в отсутствие 10 мМ CaCl₂ и 0.4 мкМ специфического ингибитора кальпаинов N-ацетил-Leu-Leu-норлейцинал (Sigma). Образовавшиеся продукты регистрировали на флуориметре при длине волны возбуждения 380 нм и эмиссии 440 нм. Окончательные расчеты про-

водили по разнице между полной и остаточной активностями в присутствии соответствующих ингибиторов. За единицу активности протеасом или кальпаинов принимали количество фермента, при котором гидролизуется 1 нмоль соответствующего субстрата в течение 1 мин. Удельную активность протеасом и кальпаинов 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, LMP7, PA28 β , Rpt6) 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. Достоверность различий между группами определяли с помощью непараметрического критерия Манна – Уитни для независимых выборок. Также был проведен дисперсионный анализ с использованием непараметрического критерия Краскол – Уоллиса (F). Рассчитывался коэффициент ранговой корреляции Спирмена для оценки взаимосвязи признаков. В таблицах все результаты представлены как медиана, разброс значений – как 25–75 % квартиль. Различия считались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При изучении активности протеасомной и кальпаиновой внутриклеточных протеолитических систем в опухолевой ткани методом дисперсионного анализа было выявлено значимое изменение

химотрипсинподобной активности протеасом при различных молекулярных подтипах опухоли ($H=8,02$; $p=0,04$).

При попарном сравнении исследуемых групп показано, что более низкие значения ХПА активности были для HER-2 позитивного РМЖ по сравнению с другими молекулярными подтипами опухоли ($p < 0,05$) (таблица). При трижды негативном РМЖ ХПА активность была в 1,3 раза выше по сравнению с люминальным А раком ($p < 0,05$).

Значимых изменений КПА и АК в зависимости от молекулярного типа опухоли обнаружено не было. При этом следует отметить, что наименьшие медианные значения активности КПА и АК были зарегистрированы для HER-2 позитивного РМЖ, при люминальном В РМЖ была отмечена максимальная КПА активность протеасом, а наиболее высокие значения активности кальпаинов были получены при трижды негативном РМЖ.

Вероятно, изменение активности протеасом может быть связано с их субъединичным составом. Именно поэтому на следующем этапе исследования проводилась оценка особенностей субъединичного состава протеасом при различных молекулярных подтипах РМЖ. При различных молекулярных подтипах опухоли было зарегистрировано изменение экспрессии PA28 β регуляторной субъединицы 20S протеасом методом дисперсионного анализа ($H=6,82$; $p=0,04$).

При попарном сравнении значимые изменения были зарегистрированы для $\alpha 1\alpha 2\alpha 3\alpha 5\alpha 6\alpha 7$ субъединиц тотального пула протеасом и PA28 β субъединиц. Так, при люминальном А раке выявлено повышение содержания субъединиц $\alpha 1\alpha 2\alpha 3\alpha 5\alpha 6\alpha 7$ в 1,7 раза по сравнению с люминальным В раком. Содержание PA28 β субъединицы было выше в 2,6 раза при люминальном А РМЖ, в 3 раза – при люминальном В и в 1,7 раза при HER-2 позитивном РМЖ по сравнению с больными, имеющими трижды негативный фенотип опухоли ($p < 0,05$) (рис. 1).

Таблица

Изменение активности протеасомной и кальпаиновой внутриклеточных протеолитических систем в опухолевой ткани при различных молекулярных подтипах рака молочной железы

| Молекулярный подтип РМЖ | Химотрипсиноподобная активность протеасом | Каспазаподобная активность протеасом | Активность кальпаинов |
|--------------------------|---|--------------------------------------|-----------------------|
| Люминальный А (n=67) | 37,7* (16,5–81,9) | 47,4 (21,3–183,6) | 71,3 (36,1–171,6) |
| Люминальный В (n=54) | 45,7* (19,8–83,2) | 94,4 (30,8–298,4) | 77,3 (55,9–111,9) |
| Трижды негативный (n=19) | 50,6* ** (34,9–113,4) | 51,4 (35,3–151,5) | 99,9 (92,7–163,3) |
| HER-2 позитивный (n=7) | 15,8 (9,6–16,9) | 12,5 (25,4–132,9) | 64,7 (43,5–142,7) |

Примечание: * – значимость различий с группой HER-2 позитивный рак молочной железы, $p < 0,05$; ** – значимость различий с группой люминальный А рак молочной железы, $p < 0,05$.

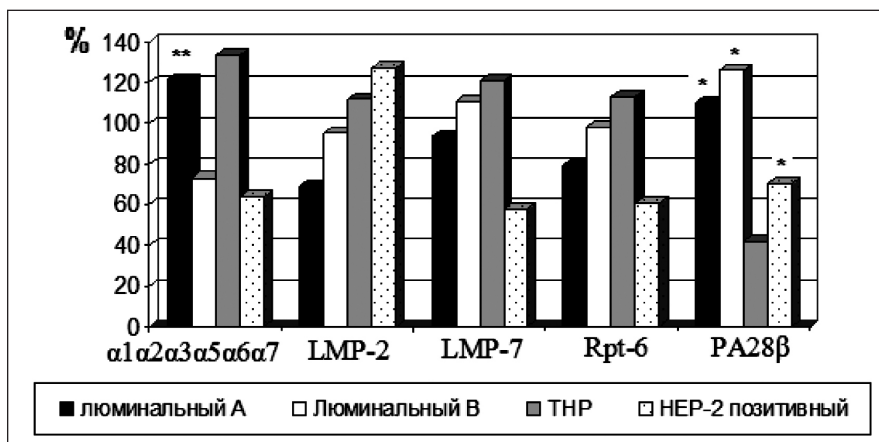


Рис. 1. Субъединичный состав протеасом в опухолевой ткани больных различными молекулярными подтипами рака молочной железы. Примечание: за 100 % принят уровень субъединиц в неизменной ткани; * – значимость различий с группой трижды негативного РМЖ, $p < 0,05$; ** – значимость различий с группой люминальный В рак молочной железы, $p < 0,05$

Обобщая данные об активности и содержании внутриклеточных протеолитических систем при различных молекулярных подтипах РМЖ, следует отметить, что для люминального А рака были характерны умеренные значения ХПА, КПА активности протеасом и активности кальпаинов в опухоли. Особенностью субъединичного состава протеасом люминального А РМЖ является высокое содержание PA28β – регуляторных субъединиц 20S протеасом и α1α2α3α5α6α7 субъединиц тотального пула протеасом. Люминальный В подтип РМЖ характеризуется высокой каспазаподобной активностью протеасом, высоким содержанием PA28β субъединиц при умеренных значениях ХПА активности протеасом, активности кальпаинов, содержании регуляторных Rpt-6 субъединиц 26S протеасом, иммунных субъединиц и субъединиц тотального пула. Для трижды негативных опухолей была характерна высокая активность кальпаинов, умеренная ХПА и КПА активности протеасом и наименьшее содержание регуляторных субъединиц 20S протеасом при сравнительно высоком содержании регуляторных Rpt-6 субъединиц, иммунных субъединиц LMP-2, LMP-7 и α1α2α3α5α6α7 субъединиц. В опухолевой ткани пациентов с HER-2 позитивным РМЖ выявлены наименьшие значения активности протеасомной и кальпаиновой внутриклеточных протеолитических систем. Содержание субъединиц протеасом было сравнительно низким, за исключением содержания иммунных LMP-2 субъединиц. Вероятно, низкая активность изучаемых внутриклеточных протеолитических систем при HER-2 позитивном раке является отражением агрессивного поведения опухоли и, вероятно, может быть характерной особенностью данного типа опухолей.

При проведении корреляционного анализа выявлены определенные взаимосвязи между компонентами протеасомной и кальпаиновой протеолитических систем, характерные для различных молекулярных подтипов. Так, для люминального А РМЖ были получены прямые корреляционные зависимости между ХПА и КПА активностями протеасом ($R=0,5$; $p < 0,05$), а также между содержанием субъединиц тотального пула протеасом α1α2α3α5α6α7 и содержанием регуляторной Rpt-6 субъединицы ($R=0,4$; $p < 0,05$), что свидетельствует о преобладании при люминальном А РМЖ полного протеолиза крупных молекул, осуществляемого 26S протеасомами. При люминальном В РМЖ обнаружены прямые корреляционные зависимости между ХПА и КПА протеасом ($R=0,57$; $p < 0,05$), КПА и АК ($R=0,48$; $p < 0,05$), что свидетельствует о проявлении модулирующего действия кальпаинов на работу протеасом при данном подтипе РМЖ.

Таким образом, проведенное исследование показало отсутствие ярко выраженных, специфических для различных молекулярных подтипов РМЖ изменений в содержании изучаемых субъединиц, входящих в состав протеасом, а также активности кальпаинов. Тем не менее выявлены изменение ХПА активности и различные корреляционные взаимосвязи между показателями протеасомной и кальпаиновой систем, характерные для различных молекулярных подтипов РМЖ. Полученные нами результаты показывают, что работа протеасомной системы претерпевает изменения в зависимости от экспрессии рецепторов опухолевыми клетками, этот аспект нуждается в дальнейшем более детальном исследовании.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шарова Н.П. Протеасомы в судьбе злокачественной опухоли. Природа. 2008; 5: 20–26.
 2. Grigoreva T.A., Tribulovich V.G., Garabadzhiu A.V., Melino G., Barlev N.A. The 26S proteasome is a multifaceted target for anti-cancer therapies. Oncotarget. 2015; 6 (28): 28. doi: 10.18632/oncotarget.4619.

3. Sorimachi H., Hata S., Ono Y. Calpain chronicle an enzyme family under multidisciplinary characterization. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 2011; 87 (6): 287–327.
 4. Storr S.J., Carragher N.O., Frame M.C., Parr T., Martin S.G. The calpain system and cancer. Nat Rev Cancer. 2011 May; 11 (5): 364–74. doi: 10.1038/nrc3050.

5. Спирина Л.В., Кондакова И.В., Коломиец Л.А., Чернышова А.Л., Асадчиков А.О., Шарова Н.П., Коваль В.Д. Активность протеасом и их субединичный состав при гиперпластических процессах и раке эндометрия. Опухоли женской репродуктивной системы. 2011; 4: 64–68.
6. Иванова Э.В., Кондакова И.В., Спирина Л.В., Афанасьев С.Г., Августиневич А.В., Черемисина О.В. Химотрипсинподобная активность протеасом и общая активность кальпаинов при раке желудка и толстой кишки. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2014; 157 (6): 753–756.
7. Шашова Е.Е., Астахова Т.М., Плеханова А.С., Богомяжкова Ю.В., Лютина Ю.В., Сумеди И.Р., Слонимская Е.М., Ерохов П.А., Абрамова Е.Б., Родоман Г.В., Кузнецов Н.А., Кондакова И.В., Шарова Н.П., Чойнзонов Е.Л. Изменение химотрипсинподобной активности протеасом в развитии карцином молочной и щитовидной желез человека. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2013; 156 (8): 209–211.
8. Какурина Г.В., Кондакова И.В., Чойнзонов Е.Л., Шишкин Д.А., Черемисина О.В. Особенности протеома сыворотки крови больных плоскоклеточными карциномами головы и шеи. Сибирский онкологический журнал. 2013; 2: 62–66.
9. Юнусова Н.В., Спирина Л.В., Кондакова И.В., Коломиец Л.А., Виллерт А.Б., Шпилева О.В. Экспрессия и активность протеаз при метастазировании рака яичников. Известия Российской академии наук. Серия биологическая. 2014; 5: 448–455.
10. Юрмазов З.А., Спирина Л.В., Усынин Е.А., Кондакова И.В., Слонимская Е.М. Молекулярные показатели, связанные с эффективностью терапии эверолимусом у больных диссеминированным раком почки. Сибирский онкологический журнал. 2016; 15 (2): 42–47. doi:10.21294/1814-4861-2016-15-2-42-47.
11. Спирина Л.В., Усынин Е.А., Кондакова И.В., Юрмазов З.А., Слонимская Е.М. Влияние таргетной терапии на содержание транскрипционных, ростовых факторов, протеинкиназы mTOR и активности внутриклеточных протеиназ у больных диссеминированным раком почки. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2015; 160 (12): 768–772.
12. Шашова Е.Е., Кондакова И.В., Слонимская Е.М., Глуценко С.А., Колесова Е.С. Изменение химотрипсинподобной и каспаза-подобной активностей протеасом в зависимости от степени распространенности рака молочной железы. Сибирский онкологический журнал. 2013; 5 (59): 45–49.
13. Storr S.J., Lee K.W., Woolston C.M., Safuan S., Green A.R., Macmillan R.D., Benhasouna A., Parr T., Ellis I.O., Martin S.G. Calpain system protein expression in basal-like and triple-negative invasive breast cancer. *Ann Oncol.* 2011; 23 (9): 2289–2296. doi: 10.1093/annonc/mds176.
14. Слонимская Е.М., Вторушин С.В., Бабышкіна Н.Н., Паталык С.В. Роль морфологических и генетических особенностей строения рецепторов эстрогенов альфа в развитии резистентности к эндокринотерапии тамоксифеном у пациенток люминальным раком молочной железы. Сибирский онкологический журнал. 2014; 3: 39–44.
15. Babushkina N., Vtorushin S., Zavyalova M., Patalyak S., Dronova T., Litviakov N., Slonimskaya E., Kzhyshkowska J., Cherdyntseva N., Choynzonov E. The distribution pattern of ERα expression, ESR1 genetic variation and expression of growth factor receptors: association with breast cancer prognosis in Russian patients treated with adjuvant tamoxifen. *Clin Exp Med.* 2016. doi:10.1007/s10238-016-0428-z.
16. Bonella F., Sixt S.U., Thomassen J., Schmidt M., Cai M., Mori T., Guzman J., Costabel U. Extracellular 20S proteasome in BAL and serum of patients with alveolar proteinosis. *Immunobiology.* 2015; 220 (3): 382–388. doi:10.1016/j.imbio.2014.10.010.
17. Ogawa S., Shih L.-Y., Suzuki T., Otsu M., Nakauchi H., Koefler H.P., Sanada M. Deregulated intracellular signaling by mutated c-CBL in myeloid neoplasms. *Clin Cancer Res.* 2010; 16: 3825–31. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2341.
18. Powers G.L., Ellison-Zelski S.J., Casa A.J. Proteasome inhibition represses ER gene expression in ER+ cells – a new link between proteasome activity and estrogen signaling in breast cancer. *Oncogene.* 2010; 29: 1509–1518. doi: 10.1038/ncr.2009.434.
19. Spirina L.V., Kondakova I.V., Choynzonov E.L., Chigevskaya S.Y., Shishkin D.A., Kulbakin D.Y. Expression of vascular endothelial growth factor and transcription factors HIF-1, NF-KB expression in squamous cell carcinoma of head and neck; association with proteasome and calpain activities. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2013; 139 (4): 625–633. doi: 10.1007/s00432-012-1366-0. doi: 10.1007/s00432-012-1366-0
20. Shashova E., Lyupina Yu.V., Glushchenko S.A., Slonimskaya E.M., Savenkova O.V., Kulikov A.M., Gornostaev N.G., Kondakova I.V., Sharova N.P. Proteasome functioning in breast cancer: connection with clinical-pathological factors. *PLOS ONE.* 2014; 9 (10): e109933. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0109933>.
21. Ben-Shahar S., Komlos A., Nadav E., Shaked I., Ziv T., Admon A., DeMartino G.N., Reiss Y. 26 S proteasome-mediated production of an authentic major histocompatibility class I-restricted epitope from an intact protein substrate. *J Biol Chem.* 1999; 274 (31): 21963–21972.
22. Sandmann S., Prenzel F., Shaw L., Schauer R., Unger T. Activity profile of calpains I and II in chronically infarcted rat myocardium-influence of the calpain inhibitor CAL 9961. *Br J Pharmacol.* 2002; 135 (8): 1951–1958.

Поступила 31.10.16
Принята в печать 15.02.17

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Шашова Елена Евгеньевна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории биохимии опухолей, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии (г. Томск, Россия). E-mail: SchaschovaEE@oncology.tomsk.ru. SPIN-код: 5079-8784.

Дорошенко Артем Васильевич, кандидат медицинских наук, научный сотрудник отделения общей онкологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии (г. Томск, Россия). E-mail: doroshenko@sibmail.com. SPIN-код: 7874-7606.

Бондарь Людмила Николаевна, врач-патологоанатом отделения патологической анатомии и цитологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии (г. Томск, Россия). E-mail: bondaroncology@mail.ru. SPIN-код: 2620-1353.

Слонимская Елена Михайловна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая отделением общей онкологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии; профессор кафедры онкологии, Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России (г. Томск, Россия). E-mail: slonimskaya@rambler.ru. SPIN-код: 7763-6417.

Кондакова Ирина Викторовна, доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией биохимии опухолей, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии (г. Томск, Россия). E-mail: kondakova@oncology.tomsk.ru. SPIN-код: 9338-4149.

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие финансовой поддержки / конфликта интересов, о котором необходимо сообщить

PROTEASOMAL AND CALPAIN PROTEOLYSIS SYSTEMS IN DIFFERENT MOLECULAR SUBTYPES OF BREAST CANCER

E.E. Shashova¹, A.V. Doroshenko¹, L.N. Bondar¹, E.M. Slonimskaya^{1,2}, I.V. Kondakova¹

Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia¹

5, Kooperativny str., 634009-Tomsk, Russia. E-mail: SchaschovaEE@oncology.tomsk.ru¹

Siberian State Medical University, Russia, Tomsk²

2, Moskovskiy Tract, 634050-Tomsk, Russia²

Abstract

The characteristics of calpain and proteasome systems in different molecular subtypes of breast cancer were studied. Tumor samples were obtained from 147 breast cancer patients, who were not previously treated with neoadjuvant therapy. Changes in the chymotrypsin-like proteasome activity and the correlation between proteasome and calpain activities were shown in different molecular subtypes of breast cancer. No changes in the calpain activity and proteasome subunits specific for various molecular subtypes of breast cancer were found. Our results show that the proteasome function undergoes changes depending on the receptor expression by tumor cells and this aspect should be further investigated.

Key words: molecular subtypes of breast cancer, chymotrypsin-like activity of proteasomes, caspase-like activity of proteasomes, subunits of proteasomes, calpain activity.

REFERENCES

1. Sharova N.P. Role of proteasomes in cancer. *Nature*. 2008; 5: 20–26. [in Russian]
2. Grigoreva T.A., Tribulovich V.G., Garabadzhiu A.V., Melino G., Barlev N.A. The 26S proteasome is a multifaceted target for anti-cancer therapies. *Oncotarget*. 2015; 6 (28): 28. doi: 10.18632/oncotarget.4619.
3. Sorimachi H., Hata S., Ono Y. Calpain chronicle an enzyme family under multidisciplinary characterization. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2011; 87 (6): 287–327.
4. Storr S.J., Carragher N.O., Frame M.C., Parr T., Martin S.G. The calpain system and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2011 May; 11 (5): 364–74. doi: 10.1038/nrc3050.
5. Spirina L.V., Kondakova I.V., Kolomiets L.A., Chernyshova A.L., Asachikova O.N., Sharova N.P., Koval V.D. Proteasome activity and their subunit composition in endometrial hyperplasia and cancer. Tumors of female reproductive system. 2011; 4: 64–68. [in Russian]
6. Ivanova E.V., Kondakova I.V., Spirina L.V., Afanasyev S.G., Cheremisina O.V. Chymotrypsin-like proteasome activity and total activity of calpains in gastric and colon cancers. *Newsletter of experimental biology and medicine*. 2014; 157 (6): 753–756. [in Russian]
7. Shashova E.E., Astakhova T.M., Plekhanova A.S., Bogomyagkova Yu.V., Lyupina Yu.V., Sumedi I.R., Slonimskaya E.M., Erokhov P.A., Abramova E.B., Rodoman G.V., Kuznetsov N.A., Kondakova I.V., Sharova N.P. Changes in chymotrypsin-like proteasome activity in the development of breast and thyroid carcinomas. *Bull Exp Biol Med*. 2013; 156 (8): 209–211. [in Russian]
8. Kakurina G.V., Kondakova I.V., Choinzonov E.L., Shishkin D.A., Cheremisina O.V. Assessment of blood serum proteome in patients with squamous cell head and neck carcinoma. *Siberian Journal of Oncology*. 2013. 2: 62–66. [in Russian]
9. Yunusova N.V., Spirina L.V., Kondakova I.V., Kolomiets L.A., Villeret A.B., Shpilyeva O.V. Expression and activity of proteases in metastatic ovarian cancer. *Proceedings of the Russian Academy of Sciences. The biological series*. 2014; 5: 448–455. [in Russian]
10. Yurmazov Z.A., Spirina L.V., Usynin E.A., Kondakova I.V., Slonimskaya E.M. Molecular factors related to everolimus efficacy in patients with disseminated kidney cancer. *Siberian Journal of Oncology*. 2016; 15 (2): 42–47. doi:10.21294/1814-4861-2016-15-2-42-47. [in Russian]
11. Yurmazov Z.A., Spirina L.V., Usynin E.A., Kondakova I.V., Slonimskaya E.M. The effect of targeted therapy on the content of transcription and growth factors, mTOR proteinase and activity of intracellular proteinases in patients with disseminated kidney cancer. *Bull Exp Biol Med*. 2015; 160 (12): 768–772. [in Russian]
12. Shashova E.E., Kondakova I.V., Slonimskaya E.M., Glushchenko S.A., Kolegova E.S. Changes in chymotrypsin-like and caspase-like proteasome activity depending on the extent of breast cancer involvement. *Siberian Journal of Oncology*. 2013; 5: 45–49. [in Russian]
13. Storr S.J., Lee K.W., Woolston C.M., Safuan S., Green A.R., Macmillan R.D., Benhasouna A., Parr T., Ellis I.O., Martin S.G. Calpain system protein expression in basal-like and triple-negative invasive breast cancer. *Ann Oncol*. 2011; 23 (9): 2289–2296. doi: 10.1093/annonc/mds176.
14. Slonimskaya E.M., Vtorushin S.V., Babushkina N.N., Patalyuk S.V. Role of morphological and genetic characteristics of estrogen receptor alpha in the development of resistance to endocrinotherapy with tamoxifen in patients with luminal breast cancer. *Siberian Journal of Oncology*. 2014; 3: 39–44. [in Russian]
15. Babushkina N., Vtorushin S., Zavyalova M., Patalyuk S., Dronova T., Litviakov N., Slonimskaya E., Kzhyshkowska J., Cherdynitseva N., Choyznzonov E. The distribution pattern of ERα expression, ESR1 genetic variation and expression of growth factor receptors: association with breast cancer prognosis in Russian patients treated with adjuvant tamoxifen. *Clin Exp Med*. 2016. doi:10.1007/s10238-016-0428-z.
16. Bonella F., Sixt S.U., Thomassen J., Schmidt M., Cai M., Mori T., Guzman J., Costabel U. Extracellular 20S proteasome in BAL and serum of patients with alveolar proteinosis. *Immunobiology*. 2015; 220 (3): 382–388. doi:10.1016/j.imbio.2014.10.010.
17. Ogawa S., Shih L.-Y., Suzuki T., Otsu M., Nakauchi H., Koefler H.P., Sanada M. Deregulated intracellular signaling by mutated c-CBL in myeloid neoplasms. *Clin Cancer Res*. 2010; 16: 3825–31. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2341.
18. Powers G.L., Ellison-Zelski S.J., Casa A.J. Proteasome inhibition represses ER gene expression in ER+ cells – a new link between proteasome activity and estrogen signaling in breast cancer. *Oncogene*. 2010; 29: 1509–1518. doi: 10.1038/onc.2009.434.
19. Spirina L.V., Kondakova I.V., Choyznzonov E.L., Chigevskaya S.Y., Shishkin D.A., Kulbakin D.Y. Expression of vascular endothelial growth factor and transcription factors HIF-1, NF-KB expression in squamous cell carcinoma of head and neck; association with proteasome and calpain activities. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2013; 139 (4): 625–633. doi: 10.1007/s00432-012-1366-0. doi: 10.1007/s00432-012-1366-0
20. Shashova E., Lyupina Yu.V., Glushchenko S.A., Slonimskaya E.M., Savenkova O.V., Kulikov A.M., Gornostaev N.G., Kondakova I.V., Sharova N.P. Proteasome functioning in breast cancer: connection with clinical-pathological factors. *PLOS ONE*. 2014; 9 (10): e109933. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0109933>.
21. Ben-Shahar S., Komlos A., Nadav E., Shaked I., Ziv T., Admon A., DeMartino G.N., Reiss Y. 26 S proteasome-mediated production of an authentic major histocompatibility class I-restricted epitope from an intact protein substrate. *J Biol Chem*. 1999; 274 (31): 21963–21972.
22. Sandmann S., Prenzel F., Shaw L., Schauer R., Unger T. Activity profile of calpains I and II in chronically infarcted rat myocardium-influence of the calpain inhibitor CAL 9961. *Br J Pharmacol*. 2002; 135 (8): 1951–1958.

Received 31.10.16
Accepted 15.02.17

ABOUT THE AUTHORS

Shashova Elena E., MD, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Tumor Biochemistry, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). E-mail: SchaschovaEE@oncology.tomsk.ru. SPIN-code: 5079-8784.

Doroshenko Artem V., MD, PhD, Researcher, General Oncology Department, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). E-mail: doroshenko@sibmail.com. SPIN-code: 7874-7606.

Bondar Lyudmila N., MD, Physician, Department of Pathological Anatomy and Cytology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). E-mail: bondaroncology@mail.ru. SPIN-code: 2620-1353.

Slonimskaya Elena M., MD, DSc, Professor, Head of General Oncology Department, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences; Professor of the Department of Oncology, Siberian State Medical University (Tomsk, Russia). E-mail: slonimskaya@rambler.ru. SPIN-code: 7763-6417.

Kondakova Irina V., MD, DSc, Head of Laboratory of Tumor Biochemistry, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). E-mail: kondakova@oncology.tomsk.ru. SPIN-code: 9338-4149.

Authors declare lack of the possible conflicts of interests