

Засадкевич Ю.М.^{1,2}, Бриллиант А. А.¹, Сазонов С. В.^{1,2}

Экспрессия эпителиальных кадгерinov и ассоциированных молекул при люминальном А подтипе рака молочной железы

1 – ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий, г. Екатеринбург; 2 – ГБОУ ВПО Уральский государственный медицинский университет, г. Екатеринбург

Zasadkevich Y.M., Brilliant A.A., Sazonov S.V.

Role of e- and p-cadherins in basal-like type of invasive lobular breast cancer

Резюме

Нами изучена экспрессия E-кадгерина, P-кадгерина и ассоциированных с ними молекул β -катенина и p120-катенина при при базальноподобном типе инвазивного долькового рака молочной железы. В исследуемую группу вошли 50 соответствующих случаев. Экспрессию кадгерinov и ассоциированных с ними молекул на клетках рака молочной железы определяли при помощи иммуногистохимического метода с использованием специфических антител. В большинстве случаев (88%) обнаружена коэкспрессия E-кадгерина и P-кадгерина. Ассоциированные с E- и P-кадгеринoм β - и p120-катенины экспрессировались в 28 и 84% случаев соответственно. Корреляция между указанными параметрами составила $r=0,36$ ($p<0,05$). Появление экспрессии β - и p120-катенинов свидетельствует о запуске сигнальных путей, приводящих к увеличению подвижности и инвазии опухолевых клеток. Также выявлена корреляционная связь между экспрессией P-кадгерина и p120-катенина, $r=0,43$ ($p<0,05$), что подтверждает реализацию сигнального пути P-кадгерин-p120-катенин-RhoGTFase, Rac1, Cdc42, результатом которого является дестабилизация актинового цитоскелета, увеличение подвижности и инвазии опухолевых клеток.

Ключевые слова: рак молочной железы, базальноподобный подтип, кадгерины, эпителиально-мезенхимальный переход, метастазирование

Summary

The expression of E-, P-cadherins and associated molecules β - and p120-catenins was examined. The studied group included 50 appropriated cases. Expression of E-cadherin and associated molecules on breast cancer cells was detected by immunohistochemical method with use of specific antibodies. In the majority of the cases (88%) coexpression of E- and P-cadherins was found. β - and p120-catenins, which associated with E- and P-cadherins, expressed in 28 and 84% respectively. The correlation between the parameters was $r=0.36$ ($p<0.05$). The appearance of β - and p120-catenins expression suggests start of signal pathways leading to increase of motility and invasion of breast cancer cells. Also, the correlation between P-cadherin and p120-catenin was found ($r=0.43$, $p<0.05$), that proves realization of P-cadherin-p120-catenin-RhoGTFase, Rac1, Cdc42 pathway, results in destabilization of actin cytoskeleton, increase of motility and invasion of tumor cells.

Keywords: basal-like breast cancer, cadherins, epithelial-mesenchymal transition, metastasis

Введение

Одним из этапов метастазирования при развитии инвазивного долькового рака молочной железы является потеря адгезии опухолевых клеток, опосредованная снижением экспрессии молекул E-кадгерина, что способствует активации ряда сигнальных механизмов, приводящих к увеличению миграции, выживаемости, а также подвижности и инвазивной способности опухолевых клеток [1,2].

На опухолевых клетках появляется трансмембранная экспрессия P-кадгерина, который в норме присутствует только в мезоэпителиальных клетках протоков молочной железы. Считается, что P-кадгерин активирует сигнальные механизмы, также приводящие к увеличению подвижности и инвазии опухолевых клеток [3].

Аберрантная экспрессия E- и P-кадгерinov приводит к дезинтеграции кадгерин-катенинового комплекса, результатом которой служит запуск нескольких сигнальных

путей, таких как канонический сигнальный путь Wnt и сигнальный путь с участием RhoGTPаз, и высвобождение сигнальных молекул β - и p120-катенинов из комплекса. Активация первого сигнального пути, главным образом, способствует увеличению миграции и выживаемости опухолевых клеток, в то время как активация второго сигнального пути обеспечивает подвижность клеток и способствует их инвазии в окружающие ткани [1,4].

Материалы и методы

Исследованы 50 случаев инвазивного дольчатого рака молочной железы, относящихся к базальноподобному подтипу по иммуногистохимической классификации [5,6]. Исследование проводили при помощи иммуногистохимического метода. Базальноподобный подтип рака молочной железы определялся по отсутствию экспрессии ER, PR, HER-2/neu на клетках опухоли. Изучалась экспрессия E-кадгерина, P-кадгерина, β -катенина и p120-катенина.

Для определения экспрессии E-кадгерина использовались кроличьи моноклональные античеловеческие антитела E-cadherin (Clone EP700Y, CellMarque, США), β -катенина - мышинные моноклональные античеловеческие антитела β -catenin (Clone 14, Ventana, США), p120-катенина - мышинные моноклональные античеловеческие антитела p120 catenin (Clone 98, Ventana, США), P-кадгерина - мышинные моноклональные античеловеческие антитела P-cadherin (Clone 56C1, Monosan, Нидерланды). Определение экспрессии HER-2/neu на клетках опухоли осуществлялось с помощью кроличьих моноклональных антител c-erb-2/HER-2 (Clone 4B5, Ventana, США). Для определения ядерного индекса пролиферации опухоли использовались кроличьи моноклональные античеловеческие антитела Ki-67 Antigen (SpringBioscience, США), рецепторов эстрогена и прогестерона на ядрах клеток опухоли с помощью кроличьих моноклональных античеловеческих антител EstrogenReceptor, ProgesteroneReceptor (SpringBioscience, США).

Оценка иммуногистохимического окрашивания осуществлялась полуколичественным методом. Экспрессия E-кадгерина оценивалась как положительная при окрашивании $\geq 70\%$ мембран исследуемых клеток [7,8]. Наличие экспрессии P-кадгерина определялось при мембранном окрашивании $>10\%$ опухолевых клеток [7-10]. Ядерная экспрессия β -катенина считалась положительной при окрашивании хотя бы одного ядра опухолевой клетки в поле зрения на увеличении X100 [11], цитоплазматическая - при окрашивании $>10\%$ клеток опухоли [12]. Мембранное окрашивание β -катенина не учитывалось. Цитоплазматическая транслокация p120-катенина определялась по окрашиванию цитоплазм опухолевых клеток, при этом мембранное окрашивание p120-катенина не учитывалось. Экспрессия p120-катенина считалась положительной при цитоплазматическом окрашивании $>10\%$ опухолевых клеток [13,14]. Уровень ядерной экспрессии ER и PR на клетках карциномы оценивали по шкале от 0 до 8 [9,10]. Оценка уровня мембранной экспрессии

HER-2/neu опухолевыми клетками производилась по шкале от 0 до 3+ [11,15]. Уровень маркера пролиферации клеток опухоли Ki-67 оценивали по процентному отношению числа окрашенных ядер опухолевых клеток ко всем клеткам рака молочной железы (%). В каждом случае оценивали не менее 600 опухолевых клеток [12].

Результаты и обсуждение

Нами изучена экспрессия E-кадгерина и ассоциированной с ним молекулы β -катенина. Наличие экспрессии E-кадгерина было выявлено во всех 50 случаях, появление цитоплазматического окрашивания β -катенина, являющегося следствием разрушения комплекса E-кадгерин- β -катенин, отмечалось в 14 (28%) случаях. Ядерной транслокации β -катенина не обнаружено ни в одном случае.

При исследовании P-кадгерина и ассоциированной с ним молекулы p120-катенина было выявлено появление экспрессии P-кадгерина в 44 (88%) случаях, aberrантное цитоплазматическое окрашивание p120-катенина в 42 (84%) случаях. Получена положительная корреляционная связь средней силы между экспрессией P-кадгерина и p120-катенина, $r=0,43$ ($p<0,05$). Обнаруженная корреляционная связь подтверждает реализацию сигнального пути P-кадгерин-p120-катенин-RhoGTPase, Rac1, Cdc42, результатом которого является дестабилизация актинового цитоскелета, увеличение подвижности и инвазии опухолевых клеток [1].

Коэкспрессия E- и P-кадгерина отмечалась в 44 (88%) исследованных случаев. По данным ряда авторов, одновременная экспрессия обоих указанных кадгеринов связана с повышенной выживаемостью клеток опухоли и метастазированием. Клеточные механизмы, объясняющие такие результаты, на сегодняшний день остаются невыясненными [14]. Кроме того, выявлена положительная корреляционная связь между цитоплазматической экспрессией β -катенина и p120-катенина, $r=0,36$ ($p<0,05$). β -катенин высвобождается и попадает в цитоплазму в результате разрушения комплекса E-кадгерин/ β -катенин, в то время как цитоплазматическая экспрессия p120-катенина может быть обусловлена как разрушением выше указанного комплекса, так и гиперэкспрессией P-кадгерина.

Заключение

В связи с гетерогенностью изучаемой опухоли, все указанные закономерности могут быть применимы только для базальноподобного подтипа инвазивного рака молочной железы. Исследование кадгеринов и ассоциированных с ними молекул при базальноподобном подтипе рака молочной железы показало, что эпителиальные E- и P-кадгерин играют роль при развитии злокачественной опухоли и метастазировании. Высвобождение β -катенина из комплекса E-кадгерин- β -катенин запускает сигнальный каскад, итогом которого является транслокация β -катенина в ядро и запуск ряда таргетных генов, приводящих к увеличению инвазии и подвижности опухолевых клеток. Этот же эффект достигается благодаря появлению в цитоплазме молекулы p120-катенина, являющейся звеном комплексов с E- и P-кадгеринами, за счет

блокады молекулы RhoA, отвечающей за стабильность цитоскелета, а также образования ламеллоподий и филоподий. Высвобождение β -катенина и цитоплазматическая транслокация p120-катенина, по всей видимости, являются связанными процессами. Описанные механизмы необходимы для первой стадии метастазирования и способствуют запуску эпителиально-мезенхимального перехода. При этом блокируется ген, отвечающий за синтез E-кадгерина на мембране опухолевых клеток, что вновь приводит к высвобождению β -катенина из комплекса E-кадгерин- β -катенин и формированию порочного круга метастазирования. ■

Засадкевич Юлия Михайловна, ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий, ГБОУ ВПО Уральский государственный медицинский университет, г. Екатеринбург; Бриллиант Александр Александрович, к.б.н., ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий, г. Екатеринбург; Сазонов Сергей Владимирович, д.м.н., профессор, ГБОУ ВПО Уральский государственный медицинский университет, ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий, г. Екатеринбург; Автор, ответственный за переписку - Засадкевич Юлия Михайловна, zasadkevich@celltechnologies.ru. +7(343)3769828

Литература:

1. Li D.-M., Feng Y.-M. Signaling mechanism of cell adhesion molecules in breast cancer metastasis: potential therapeutic targets// *Breast Cancer Res Treat.*-2011.-N128.-P.7-21.
2. Paredes J., Figueiredo J., Albergaria A., et al. Epithelial E- and P-cadherins: role and clinical significance in cancer// *Biochimica et Biophysica Acta.*-2012.-N1826.-P.297-311.
3. Albergaria A., Ribeiro A.S., Vieira A.F., et al. P-cadherin role in normal breast development and cancer// *Int.J.Dev.Biol.*-2011.-N55.-P.811-822.
4. Засадкевич Ю.М., Сазонов С.В. Роль молекулы клеточной адгезии E-кадгерина в онтогенезе человека в норме и патологии// *Морфология.*-2014.-Т.146.-ц5.-с.78-82.
5. Cheang M.C.U., Chia S.K., Voduc D., et al. Ki67 Index, HER2 Status, and Prognosis of Patients With Luminal B Breast Cancer// *J Natl Cancer Inst.*-2009.-V.101.-N10.-P.736-750
6. Семглазов В.Ф., Палтуев Р.М., Семглазова Т.Ю. и соавт. Клинические рекомендации по диагностике и лечению рака молочной железы// *АБВ-пресс.-Санкт-Петербург.*-2013.-238 с.
7. Ikeda S., Fujimori M., Shibata S. et al. Combined immunohistochemistry of μ -catenin, cytokeratin 7, and cytokeratin 20 is useful in discriminating primary lung adenocarcinomas from metastatic colorectal cancer// *BMC Cancer.*-2006.-V.6.-N31.
8. Liu Y., Wang Y., Zhang Y., et al. Abnormal expression of p120-catenin, E-cadherin, and small GTPases is significantly associated with malignant phenotype of human lung cancer// *Lung Cancer.*-2009.-N63.-P.375-382.
9. Allred D.C., Harvey J.M., Berardo M. et al. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis// *Mod. Pathol.*-1998.-N89.-P.111-117.
10. Hammond M.E., Hayes D.F., Dowsett M. et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer// *J Clin Oncol.*-2010.-Vol.28.- P.2784-2795.
11. Wolff A.C., Hammond M.E., Schwartz J.N. et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer// *J Clin Oncol.*-2007.-N25.-P.118-145.
12. Jalava P., Kuopio T., et al. Ki67 immunohistochemistry: a valuable marker in prognostication but with a risk of misclassification: proliferation subgroups formed based on Ki67 immunoreactivity and standardized mitotic index// *Histopathology.*-2006.-V48.-N6.-P.674-82.
13. Carey L.A., Perou C.M., Livasy C.A., et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study// *JAMA.*-2006.-V.295.-N21.-p.2492-2502.
14. Ribeiro A.S., Sousa B., Carreto L. et al. P-cadherin role is dependent on E-cadherin cellular context: a proof of concept using the breast cancer model// *J Pathol.*-2013.-N229.-P.705-718.
15. Bilous M., Dowsett M., Isola J., et al. Current perspectives on HER2 testing: a review of national testing guidelines// *Mol Pathol.*-2003.-N16.-P.173-182.