

КЛИНИЧЕСКИЕ ПЕРСПЕКТИВЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЯДЕРНОГО ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА NF-κB ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Е.С. Герштейн, А.М. Платова, В.П. Летягин, Н.Е. Кушлинский

ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

CLINICAL PERSPECTIVES FOR STUDYING THE NUCLEAR TRANSCRIPTION FACTOR NF-κB IN BREAST CANCER

E.S. Gershtein, A.M. Platova, V.P. Letyagin, N.E. Kushlinsky

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

The paper describes a role of the nuclear transcription factor NF-κB in oncogenesis and presents studies of this factor in breast cancer (BC). It also shows it promising to use the values of the transcription factor NF-κB activity to identify a hormone-resistant subgroup among the patients with receptor-positive BC, in its early stages in particular.

Key words: nuclear transcription factor NF-κB, gene expression, breast cancer, perspective

Общие представления о роли NF-κB в онкогенезе

Ядерный транскрипционный фактор NF-κB был первоначально идентифицирован как белок, связывающийся со специфической декамерной последовательностью ДНК (GGG ACT TTC C) в интроне гена легких цепей иммуноглобулинов-κ в зрелых В-лимфоцитах и плазматических клетках. Позднее было продемонстрировано, что ДНК-связывающая активность NF-κB стимулируется в ответ на целый ряд экзогенных стимулов, и эта стимуляция не зависит от синтеза белка *de novo*.

NF-κB играет важную роль в клеточной пролиферации, апоптозе, воспалительной и аутоиммунной реакциях, поскольку он регулирует экспрессию генов, вовлеченных в эти процессы [1]. Он представляет собой гетеродимерный комплекс белков семейства Rel, которые в большинстве покоящихся клеток неактивны и находятся в цитоплазме в комплексе со специфическими ингибиторами — IκB. Идентифицировано 5 белков семейства NF-κB, содержащих общий ДНК-связывающий домен: NF-κB1 (p50/p105), NF-κB2 (p52/p100), RelA (p65), RelB и c-Rel. Основной формой существования этих белков в большинстве типов клеток является гетеродимер p50/RelA(p65). Известно также о существовании 7 ингибиторов NF-κB: IκB-α, IκB-β, IκB-γ, IκB-ε, Vcl-3, p100 и p105 [2].

При поступлении в клетку регуляторного стимула сигнальный каскад NF-κB активируется, происходят фосфорилирование ингибиторного белка специфическими IκB-киназами, а затем его полная деградация, и свободный активный NF-κB поступает в ядро. Схема внутриклеточных сигнальных путей, приводящих к активации NF-κB и влияющих на выживание и пролиферацию опухолевых клеток, представлена на рисунке. В качестве активирующих агентов выступают, как прави-

ло, различные факторы роста (например, эпидермальный — ЭФР или α-трансформирующий — ТФР-α) и цитокины, бактериальные токсины и вирусные агенты, а также такие внешние пронекротические факторы, как γ- и ультрафиолетовое облучение, кислородные радикалы и т.п. [3].

Одним из ключевых вышележащих эффекторных механизмов, активирующих NF-κB, является PI3K/Akt-сигнальный путь. Его основные компоненты: фосфатидилинозитол-3-киназа (PI3K), фосфорилирующая инозитольное кольцо в положении D-3, а также серин/треониновая протеинкиназа-B (Akt). Активность NF-κB может модулироваться также с участием другой важнейшей сигнальной системы — онкогена Ras и нижележащего каскада митоген-активируемых протеинкиназ (МАП-киназ). Регуляция NF-κB сигнального пути нарушена во многих опухолях человека, в том числе и при раке молочной железы (РМЖ). В большинстве опухолевых клеток NF-κB постоянно активирован и находится в ядре. Эта активация не только защищает клетки от апоптоза, но также увеличивает их пролиферативную активность, инвазивный, метастатический и ангиогенный потенциал [3, 4].

Экспериментальные исследования NF-κB при РМЖ

Установлено, что NF-κB играет важную роль не только в этиологии, патогенезе и прогрессии РМЖ, но и в формировании и функционировании нормальной молочной железы. Так, в опытах на трансгенных мышях четко показано, что этот фактор необходим для правильного развития железистой ткани: при блокировании активации NF-κB наблюдались серьезные нарушения лактации [5, 6].

NF-κB-сигнальный путь играет решающую роль в индукции и поддержании эпителиально-мезенхимального перехода (epithelial-mesenchymal transition — EMT) — процесса изменения эпителиально-

системах, а данные об экспрессии этого фактора в опухолях человека, собранные с помощью клинического материала, единичны, выполнены с использованием различных методических подходов и требуют дальнейшего подтверждения.

В первом исследовании такого рода для оценки степени активации различных субъединиц NF-κB были использованы полуколичественные методы электрофоретического торможения в геле (EMSA), иммуноблоттинга ядерных экстрактов и иммуногистохимического (ИГХ) окрашивания срезов [22]. В этой работе было впервые показано, что в опухолях больных РМЖ значительно активированы по сравнению с окружающей неизменной тканью p50- и p52-субъединицы NF-κB, а также один из гомологов IκB — Bcl-3, активирующий именно эти субъединицы транскрипционного фактора.

D.K. Biswas и соавт. [1] также оценивали степень активации NF-κB с помощью метода EMSA и впервые разделили опухоли (31 образец) на подгруппы в зависимости от РЭ и Her-2/neu-статуса. Активированный NF-κB выявлялся преимущественно в РЭ⁻-опухолях: в 6 из 7 РЭ⁻Her-2⁺-образцов, в 3 из 9 РЭ⁻Her-2⁻ и всего лишь в 2 из 15 РЭ⁺-опухолей. Такое соотношение соответствует экспериментальным данным об активации NF-κB-сигнального пути в гормоннезависимых клеточных линиях с высокой экспрессией Her-2/neu или РЭФР [8].

В дальнейшем внимание исследователей было привлечено в основном к рецепторположительному РМЖ. Так, в работе Y. Zhou и соавт. [23] был впервые использован количественный иммуноферментный метод для оценки ДНК-связывающей активности 2 субъединиц NF-κB — p50 и p65 — в опухолях 81 больной ранним РЭ⁺ РМЖ. Пациентки были разделены на 2 подгруппы: 1-я — 22 больные с высоким (> 100 фмоль/мг белка) и 2-я — 59 больных с относительно низким (21—87 фмоль/мг белка) содержанием РЭ в опухоли. ДНК-связывающая активность обеих субъединиц была достоверно выше в опухолях больных 2-й группы по сравнению с таковой в 1-й группе, при этом в обеих подгруппах связывающая активность p50 была в несколько раз выше, чем активность p65. Последнее наблюдение согласуется с описанными выше данными [22].

У 59 пациенток 2-й группы, получавших адъювантно тамоксифен по одной и той же схеме, была исследована взаимосвязь уровня активности NF-κB и безрецидивной/безметастатической выживаемости [23]. Оказалось, что в опухолях 13 из этих больных, у которых за время наблюдения (80 мес) произошло прогрессирование заболевания, активность обеих ДНК-связывающих субъединиц NF-κB была достоверно выше, чем в опухолях пациенток, наблюдавшихся без признаков возврата болезни на фоне приема тамоксифена. ДНК-связывающая активность NF-κB p50 и p65 положительно коррели-

ровала с несколькими биологическими маркерами РМЖ (в том числе с Her-2/neu), но только 2 из этих маркеров — содержание активатора плазминогена урокиназного типа (uPA) и ДНК-связывающая активность транскрипционного фактора AP-1 (activating protein 1) — оказывали такое же влияние на прогноз, как активность NF-κB. Авторами были предложены условные границы активности субъединиц NF-κB, позволяющие стратифицировать РЭ⁺-больных РМЖ с относительно низким содержанием рецепторов в опухоли на чувствительных и нечувствительных к тамоксифену. При этом более значимые различия были получены в результате стратификации на основании активности p50 субъединицы.

В 2007 г. та же группа исследователей использовала метод микрочипов для определения уровня экспрессии комплекса генов, регулируемых NF-κB и другим транскрипционным фактором AP-1 [11]. Было обследовано 4 группы больных РМЖ без метастазов в лимфатических узлах (ЛУ) с РЭ⁺-опухолями (всего — 262 пациентки), лечившихся в разных медицинских центрах и получавших адъювантно тамоксифен в различных режимах. Выявлено 3 NF-κB/AP-1-активируемых гена — циклин *D1*, *uPA* и *VEGF*, с помощью которых можно разделить больных РЭ⁺-РМЖ без метастазов в ЛУ на подгруппы с более ранним и более поздним прогрессированием, отмеченным на фоне тамоксифена, независимо от режима приема препарата. Наиболее значимыми различия были в группе молодых больных. Таким образом, оценка экспрессии этих генов, наряду с оценкой уровня активации самих транскрипционных факторов, может оказаться полезной для выявления группы больных, резистентных к тамоксифену, несмотря на наличие положительного рецепторного статуса опухоли.

C. Liu и соавт. [24] исследовали прогностическое значение активированного NF-κB у 130 РЭ⁺-больных РМЖ с метастазами в ЛУ с помощью ИГХ-метода оценки экспрессии данного белка. Обнаружено достоверное уменьшение безрецидивной и общей выживаемости у больных с повышенной экспрессией активированного NF-κB в опухоли, подтвержденное данными многофакторного анализа. Одновременно была исследована экспрессия других сигнальных белков: фосфорилированной киназы Akt (pAkt) — одного из вышележащих активаторов NF-κB, фосфорилированного транскрипционного фактора STAT3, РЭФР, Her-2/neu, фосфатазы PTEN, белка Ki67. Продемонстрирована положительная корреляционная взаимосвязь между уровнями экспрессии NF-κB и pAkt. Оба эти показателя, в свою очередь, коррелировали с гиперэкспрессией Her-2/neu и степенью злокачественности РМЖ. На основании этих результатов авторы предположили, что активация pAkt/NF-κB-сигнального пути ухудшает прогноз РЭ⁺-РМЖ с метастазами в ЛУ.

S.J. van Laere и соавт. [9] изучали активацию NF-κB в отечно-инфильтративном и обычном РМЖ с использованием современных технологий определения «генных подписей» опухолей методом количественной полимеразной цепной реакции. Определяли несколько «подписей»: набор генов, характеризующих активность РЭ, набор генов, характеризующих активность МАП-киназного сигнального пути, группу из 8 генов, активируемых NF-κB, а также смешанную «подпись», объединяющую РЭ- и NF-κB-регулируемые гены. Оказалось, что экспрессия большинства РЭ-модулируемых генов значительно увеличена в опухолях с транскрипционно неактивированным NF-κB. Более того, наблюдалась отрицательная корреляция между уровнями экспрессии РЭ- и NF-κB-активируемых генов, что подтверждает обратное соотношение между активностью РЭ- и NF-κB-сигнальных путей. Отечно-инфильтративные раки характеризовались низкой экспрессией

РЭ-зависимых генов и высокой — NF-κB-активируемых генов. В опухолях с таким фенотипом (как инфильтративных, так и неинфильтративных) выявлена также гиперэкспрессия РЭФР и/или Her-2. Авторы полагают, что именно повышенная экспрессия этих рецепторных белков приводит к активации NF-κB и подавлению активности РЭ.

Таким образом, несмотря на различия методических подходов и разнообразие маркеров, исследовавшихся в комплексе с NF-κB, все авторы приходят к единому мнению о перспективности использования показателей активности транскрипционного фактора NF-κB для выявления гормонорезистентной подгруппы среди больных рецепторположительным РМЖ, в первую очередь на ранних стадиях заболевания. Дальнейшего клинического изучения требует вопрос о роли этих показателей в оценке и преодолении химио- и радиорезистентности РМЖ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Biswas D.K., Shi Q., Baily S. et al. NF-kappa B activation in human breast cancer specimens and its role in cell proliferation and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(27):10137—42.
2. Kim H.J., Hawke N., Baldwin A.S. NF-kappa B and IKK as therapeutic targets in cancer. *Cell Death Differ* 2006;13(5):738—47.
3. Bhat-Nakshatri P., Sweeney C.J., Nakshatri H. Identification of signal transduction pathways involved in constitutive NF-kappa B activation in breast cancer cells. *Oncogene* 2002;21(13):2066—78.
4. Zhou Y., Eppenberger-Castori S., Eppenberger U., Benz C.C. The NF-kappa B pathway and endocrine-resistant breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2005;12(Suppl 1):37—46.
5. Cao Y., Karin M. NF-kappa B in mammary gland development and breast cancer. *J Mam Gland Biol Neoplasia* 2003;8(2):215—23.
6. Connelly L., Robinson-Benion C., Chont M. et al. A transgenic model reveals important roles for the NF-kappa B alternative pathway (p100/p52) in mammary development and links to tumorigenesis. *J Biol Chem* 2007;282(13):10028—35.
7. Huber M.A., Azoitei N., Baumann B. et al. NF-kappa B is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *J Clin Invest* 2004;114(4):569—81.
8. Biswas D.K., Iglehart J.D. Linkage between EGFR family receptors and nuclear factor kappa B (NF-kappa B) signaling in breast cancer. *J Cell Physiol* 2006;209(3):645—52.
9. Van Laere S.J., van der Auwera I., van den Eynden G.G. et al. NF-kappa B activation in inflammatory breast cancer is associated with oestrogen receptor down-regulation, secondary to EGFR and/or ErbB2 overexpression and MAPK hyperactivation. *Br J Cancer* 2007;97(5):659—69.
10. Лобанова Ю.С., Щербаков А.М., Шатская В.А., Красильников М.А. Эстроген-зависимый апоптоз в клетках рака молочной железы: роль сигнального пути, регулируемого NF-κB. *Биохимия* 2007;72(3):392—401.
11. Zhou Y., Yau C., Gray J.W. et al. Enhanced NF-kappa B and AP-1 transcriptional activity associated with antiestrogen resistant breast cancer. *BMC Cancer* 2007;7:59.
12. Hernandez-Vargas H., Rodriguez-Pinilla S.M., Julian-Tendero M. et al. Gene expression profiling of breast cancer cells in response to gemcitabine: NF-kappa B pathway activation as a potential mechanism of resistance. *Breast Cancer Res Treat* 2007;102(2):157—72.
13. Weldon C.B., Burow M.E., Rolfe K.W. et al. NF-kappa B-mediated chemoresistance in breast cancer cells. *Surgery* 2001;130(2):143—50.
14. Russo S.M., Tepper J.E., Baldwin A.S. Jr. et al. Enhancement of radiosensitivity by proteasome inhibition: implications for a role of NF-kappa B. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;50(1):183—93.
15. Chen F. Endogenous inhibitors of nuclear factor-kappa B, an opportunity for cancer control. *Cancer Res* 2004;64(22):8135—8.
16. Mayo M.W., Baldwin A.S. The transcription factor NF-kappa B: control of oncogenesis and cancer therapy resistance. *Biochim Biophys Acta* 2000;1470(2):55—62.
17. Cardoso F., Ross J.S., Picart M.J. et al. Targeting the ubiquitin-proteasome pathway in breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2004;5(2):148—57.
18. Jenkins C., Hewamana S., Gilkes A. et al. Nuclear factor-kappa B as a potential therapeutic target for the novel cytotoxic agent LC-1 in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2008;143(5):661—71.
19. Pajak B., Gajkowska B., Orzechowski A. Molecular basis of parthenolide-dependent proapoptotic activity in cancer cells. *Folia Histochem Cytobiol* 2008;46(2):129—35.
20. Park B.K., Zhang H., Zeng Q. et al. NF-kappa B in breast cancer cells promotes osteolytic bone metastasis by inducing osteoclastogenesis via GM-CSF. *Nat Med* 2007;13(1):62—9.
21. Samant R.S., Clark D.W., Fillmore R.A. et al. Breast cancer metastasis suppressor 1 (BRMS1) inhibits osteopontin transcription by abrogating NF-kappa B activation. *Mol Cancer* 2007;6:6.
22. Cogswell P.C., Guttridge D.C., Funkhouser W.K., Baldwin A.S. Jr. Selective activation of NF-kappa B subunits in human breast cancer: potential roles for NF-kappa B2/p52 and for Bcl-3. *Oncogene* 2000;19(9):1123—31.
23. Zhou Y., Eppenberger-Castori S., Marx C. et al. Activation of nuclear factor-kappa B (NF-kappa B) identifies a high-risk subset of hormone-dependent breast cancers. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37(5):1130—44.
24. Liu C., Zhou S., Ke C.S. et al. Activation and prognostic significance of AKT, NF-kappa B and STAT3 in breast cancer with lymph node metastasis and estrogen receptor expression. *Ai Zheng* 2007;26(9):929—36.