

К. Г. Рукша

ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫЕ МОДИФИКАЦИИ α -ТУБУЛИНА И ИХ ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ПРИ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ

Научный руководитель канд. мед. наук, доц. А. С. Портянко

Кафедра патологической анатомии,

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

Резюме. В данном исследовании приведены результаты анализа спектра изменений экспрессии ацетилированного (Ацет-), тирозинированного (Тир-) и детирозинированного (Глу-) тубулинов в клетках колоректальной аденокарциномы, включая опухолевые почки (ОП), а также оценка их возможной предикторной и/или прогностической роли и связи с клиническим течением колоректального рака (КРР).

Ключевые слова: колоректальный рак, тубулин, микротрубочки, цитоскелет, опухолевые почки

Resume. The study shows results of analysis of changes in expression of acetylated (Acet-), tyrosinated (Tyr-) and detyrosinated (Glu-) tubulins in colorectal adenocarcinoma cells and assessment of its possible predictive and/or prognostic significance in the clinical course of colorectal cancer.

Keywords: colorectal cancer, tubulin, microtubules, cytoskeleton, tumor budding.

Актуальность. На сегодняшний день основным полем исследования молекулярных онкологов является выявление ключевых молекул патогенетического каскада при опухолевой трансформации и изучение их как потенциальных мишеней для воздействия современных лекарственных химиопрепаратов. Одной из малоизученных областей в этом направлении является цитоскелет клетки, основным компонентом которого являются микротрубочки – высоко динамичные цилиндрические структуры, состоящие из гетеродимеров α - и β - тубулина, способных, в свою очередь, подвергаться различным посттрансляционным модификациям (ПТМ). Опухоли полых органов, колоректального рака (КРР) в частности, характеризуются хорошо визуализируемым инвазивным фронтом – участком наиболее глубокого внедрения опухоли в слизистую оболочку, с присутствием также в этой области изолированных кластеров от 1 до 5 клеток с повышенной миграционной способностью – опухолевых почек (ОП), предположительно в будущем формирующих метастазы, что делает КРР хорошей моделью для изучения молекулярных изменений при инвазии.

Цель: установить спектр изменений экспрессии ацетилированного (Ацет-), тирозинированного (Тир-) и детирозинированного (Глу-) тубулинов в клетках колоректальной аденокарциномы, включая ОП, а также оценка их возможной предикторной и/или прогностической роли и связи с клиническим течением КРР

Задачи:

1. Определить особенности экспрессии Ацет-, Тир- и Глу- α -тубулина в различных компартментах колоректальной аденокарциномы и в прилежащей неопухолевой ткани.
2. Выявить связь изменений экспрессии с клиническим течением заболевания, а также морфологическими особенностями опухоли.
3. Установить возможную предикторную и/или прогностическую роль исследуемых посттрансляционных модификаций в прогнозе течения и химиочувствительности колоректального рака.

Материал и методы. Исследование было проведено на гистологическом операционном материале 125 колоректальных аденокарцином от 124 пациентов (55 мужчин и 69 женщин, средний возраст $64,6 \pm 11,1$ года), прооперированных в Минском городском клиническом онкологическом диспансере (УЗ МГКОД) одним хирургом в период с ноября 2009 г. по апрель 2011 г. Фрагменты операционного материала фиксировались в 10% нейтральном забуференном формалине и заключались в формалин, после чего из блоков изготавливались срезы толщиной 4 мкм. Гистологические срезы окрашивались с применением метода двойной иммунофлуоресценции с антителами к цитокератину AE1/3 и Ацет-, Тир- или Глу- тубулину. Съемка изображений производилась на микроскопе с флуоресцентной осью Leica DM5000 цифровой камерой Leica DFC420c с применением объектива $\times 20$ по 3 случайных непересекающихся поля зрения из центральной зоны, и 3 непересекающихся последовательных поля зрения из инвазивного фронта каждой опухоли. Для стандартизации

полученных результатов учитывались значения внутреннего позитивного контроля (нервные стволы) и отрицательных контролей для каждой серии и вычислялся нормализованный уровень экспрессии (НУЭ). Статистический анализ производился с использованием пакета RStudio, v. 0.98.1103 (RStudio, Inc., США).

Результаты и их обсуждение.

Исследуемые ПТМ тубулина экспрессировались во всех случаях, при этом в цитоплазме клеток отчетливо окрашивались нитевидные структуры, являющиеся, вероятно, микротрубочками.

Экспрессия Ацет-тубулина присутствовала во всех случаях. Был обнаружен статистически значимый нисходящий градиент экспрессии Ацет-тубулина от центра к инвазивному фронту ($p = 0,000$) с минимумом экспрессии в ОП ($p = 0,000$), а также снижение экспрессии в опухоли по сравнению с нормальной слизистой оболочкой ($p = 0,000$). Аналогичная зависимость прослеживалась и для стромального компартамента (рисунок 1).

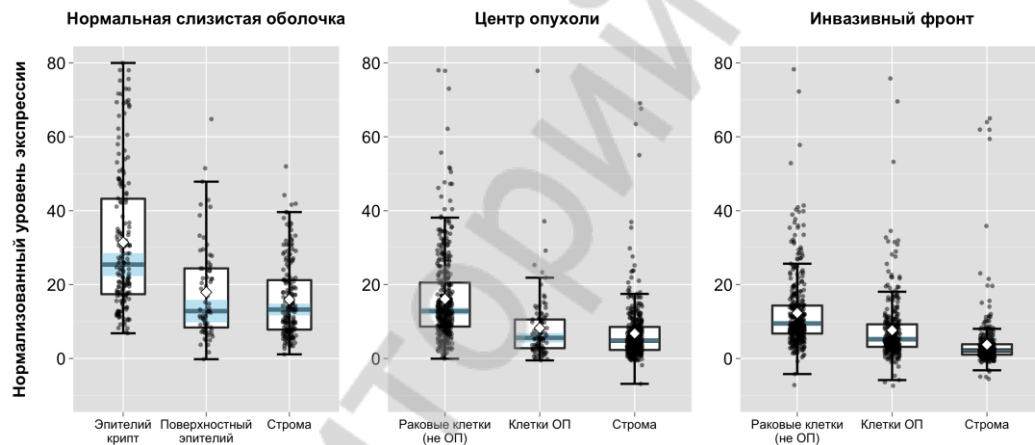


Рисунок 1 – НУЭ Ацет-тубулина в нормальной слизистой оболочке кишки, центре и инвазивном фронте КРР

Методом многофакторного линейного регрессионного анализа было установлено, что снижение экспрессии Ацет-тубулина в центре опухоли (вне ОП) ассоциировано с отсутствием полярности ядер ($p = 0,020$). При анализе выживаемости установлено, что снижение экспрессии данного изотипа в раковых клетках и строме центра опухоли связано с более вероятным прогрессированием заболевания в послеоперационный период (рисунок 2).

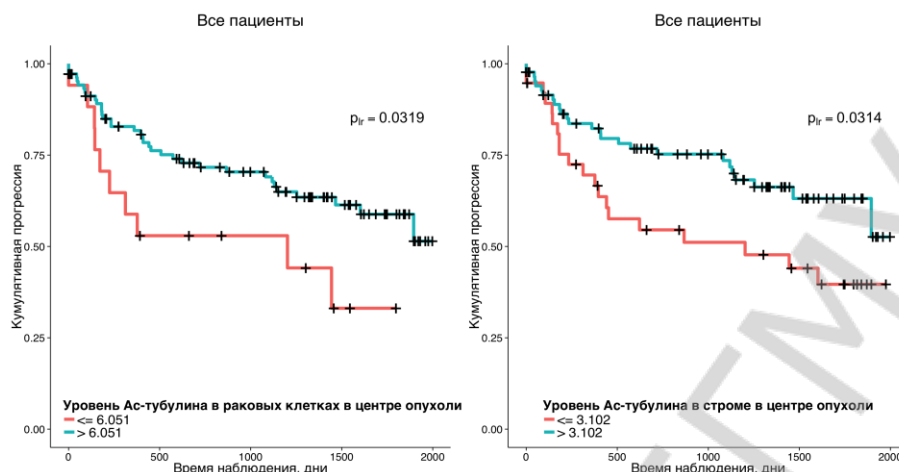


Рисунок 2 – Беспрогрессивная выживаемость пациентов с КРР при различной экспрессии Ацет-тубулина

Как в центре, так и в инвазивном фронте опухоли содержание Тир-тубулина было достоверно выше значений экспрессии в нормальной ткани ($p = 0,000$), причем клетки аденокарциномы характеризовались уменьшением содержания Тир-тубулина в инвазивном фронте по сравнению с центральной областью, минимальное содержание отмечалось в ОП инвазивного фронта. Уровень Тир-тубулина в клетках отрицательно ассоциировался с категорией pT ($p = 0,015$), отсутствием полярности ядер ($p = 0,012$), экспансивным ростом ($0,033$) и наличием Крон-подобной реакции ($p = 0,005$) и положительно – с обычным типом стромы ($p = 0,039$).

Изменение содержания уровня Тир-тубулина практически не оказывало статистически значимого влияния на опухоль-специфическую и беспрогрессивную выживаемость, за исключением достоверно неблагоприятного прогноза у пациентов со снижением уровня Тир-тубулина в ОП центральных областей до 18,33 и ниже ($p = 0,031$).

Экспрессия Глу-тубулина достоверно не варьировала в исследуемых компартаментах, за исключением снижения содержания данного изотипа в ОП инвазивного фронта по сравнению с раковыми клетками (вне ОП) центральных областей опухоли ($p = 0,005$).

Из анализируемых в данном исследовании ПТМ Глу-тубулин оказывал наибольшее влияние как на опухоль-специфическую, так и на беспрогрессивную выживаемость: даже небольшое снижение уровня данного изотипа в центре (до уровня 16,88 и ниже для раковых клеток и 21,28 и ниже для ОП) и в ОП инвазивного фронта (35,0 и ниже) опухоли сравнению с медианой экспрессии в данных компартаментах (28,2 и 24,2 для раковых клеток и ОП центра и 23,0 для ОП инвазивного фронта) ассоциировалось с достоверно более неблагоприятным прогнозом в послеоперационном периоде.

Согласно имеющимся литературным данным, Ацет-тубулин преобладает в структуре более стабильных микротрубочек, образующих реснички, жгутики, ба-

зальные тельца [2], его уровень максимален в дифференцированных клетках в интерфазном состоянии и ускоряет кинезин-1-опосредованный транспорт внутри клетки [3]. Ранее проводились исследования, указывающие на возможную роль Ацет-тубулина в регуляции клеточной подвижности: гиперэкспрессия деацетилазы гистонов (HDAC 6) приводила к снижению содержания Ацет-тубулина и, как следствие, к приобретению клетками способности к хемотаксическому движению [4]. В нашем исследовании наиболее низкий уровень экспрессии отмечался в ОП инвазивного фронта – недифференцированных клетках с повышенной подвижностью. Кроме того, сниженный уровень Ацет-тубулина ассоциировался с отрицательным прогнозом в отношении беспродвинутой выживаемости и отсутствием полярности ядер в интенсивно пролиферирующей опухолевой ткани центра опухоли, что может свидетельствовать о роли Ацет-тубулина как маркера дифференцировки клетки и его прогностическом значении. В связи с этим разработка блокаторов ферментов, регулирующих деацетилазы гистонов, является перспективным и уже исследуемым направлением при опухолях легких, предстательной железы, лейкозах.

Тир- и Глу- тубулины являются компонентами цикла тирозинирования-детирозинирования в области высоко динамичных перестраивающихся положительно заряженных концов микротрубочек. Тир-тубулин описан в более лабильных микротрубочках (интерфазная сеть, метафазное веретено) и участвует в формировании морфологически зрелой поляризованной клетки, межклеточных контактов и приобретении клеткой способности к миграции, так как связывается с белком CLIP-170 – эффектором ГТФ-азы Cdc42, являющейся центральной молекулой, обеспечивающей ориентацию клетки в пространстве [5]. Глу-тубулин является менее исследованной ПТМ, по данным большинства исследований характеризует стабильные микротрубочки аксоном жгутиков и ресничек, центриолей, микротрубочек перинуклеарной зоны [6]. Наряду с Ацет-тубулином Глу-тубулин принимает участие в кинезин-1-опосредованном транспорте и в ряде клеточных экспериментов характеризует дифференцирующиеся клетки, формирующие монослой [7]. В нашем исследовании уровень Тир-тубулина преобладал в опухоли и снижался по нисходящему градиенту от более дифференцированных к менее дифференцированным участкам, достигая минимума в ОП инвазивного фронта, кроме того, его экспрессия отрицательно ассоциировалась с экспансивным ростом, категорией pT и отсутствием поляризации ядер центра опухоли. Полученные данные подтверждают смешанные функции данной ПТМ, участвующей как в морфологической зрелости клетки, так и в ее подвижности. Что касается Глу-тубулина, была выявлена роль его даже незначительного снижения в клетках КРР как отрицательного прогностического маркера в отношении как опухоль-специфической, так и беспродвинутой выживаемости. Однако, полученные данные противоречат уже проведенным исследованиям на раке молочной железы, нейробластоме [8, 9], где напротив, повышение экспрессии Глу-тубулина ассоциировалось с неблагоприятным клиническим течением. Кроме того, паттерны внутриклеточного распределения Глу-тубулина при КРР (микротубуляр-

ный и перинуклеарный) отличаются от уже описанного перинуклеарного в стабильных полимерных микротрубочках. Таким образом, тубулин-тирозинлигаза, регулирующая цикл тирозинирования-детирозинирования (ТТЛ) также представляет собой потенциальную мишень для регуляции баланса ПТМ при опухолевых заболеваниях, однако для практического применения полученных данных требуются дальнейшие исследования разных опухолей.

Выводы:

1 При КРР наблюдается статистически значимый нисходящий градиент экспрессии от области центра опухоли к области инвазивного фронта для Ацет- и Тир-тубулинов с минимумом экспрессии в ОП инвазивного фронта для всех исследуемых ПТМ: Ацет-, Тир- и Глу- тубулинов.

2 Экспрессия Ацет- и Тир- тубулинов связана с формированием морфологически зрелых, дифференцированных клеток центра опухоли.

3 Снижение экспрессии Ацет- и Глу- тубулинов ассоциировано с неблагоприятным прогнозом в отношении беспрогрессивной и опухоль-специфической выживаемости, что позволяет их считать прогностическими маркерами течения КРР,

K. G. Ruksha

POSTTRANSLATIONAL MODIFICATIONS OF α -TUBULIN AND ITS PROGNOSTIC SIGNIFICANCE IN COLORECTAL CANCER

Tutor MD, PhD Associate professor A. S. Portyanko

Department of Pathology,

Belarusian State Medical University, Minsk

Литература

1. Raybin D., Flavin M. Enzyme, which specifically adds tyrosine to the alpha chain of tubulin / M. Flavin // *Biochemistry*. – 1977. – 16. – P. 2189-2194.
2. Luduena R.F., Banerjee A. The isotypes of tubulin: distribution and functional significance / R. F. Luduena // *The Role of Microtubules in Cell Biology, Neurobiology, and Oncology* Ed. by Fojo T. NY: Humana Press. – 2008. – P. 123-175.
3. Reed N., Cai D., Blasius T. et al. // *Curr. Biol.* – 2006. – Vol. 16. – P. 2166–2172.
4. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase / Hubbert C, Guardiola A, Shao R, et al. // *Nature*. – 2002. – P. 417, 455–458.
5. Thomas R.C., Edwards M.J., Marks R. Translocation of the retinoblastoma gene product during mitosis. / R. C. Thomas // *Exp Cell Res.* – 1996. – 223 (2). – P. 227-232.
6. Purification and characterization of basal apparatuses from a flagellate green alga. / Geimer S., Teltenkötter A., Plessman U. et al. // *Cell Motil. Cytoskeleton.* – 1997. – 37 (1). – P. 72-85.
7. The posttranslational modification of tubulin undergoes a switch from detyrosination to acetylation as epithelial cells become polarized. / Quinones G.B., Danowski B.A., Devaral A. et al. // *Mol. Biol. Cell.* – 2011. – 22 (7). – P. 1045-1057.
8. Suppression of tubulin tyrosine ligase during tumor growth. / Lafanechere L., Courtay-Cahen C., Kawakami T. et al. // *J. Cell Sci.* – 1998. – 111. – P. 171-181.
9. Tubulin detyrosination is a frequent occurrence in breast cancers of poor prognosis. / Mialhe A.,

70-я Международная научно-практическая конференция студентов и молодых учёных
"Актуальные проблемы современной медицины и фармации - 2016"

Lafanechere L., Treilleux I. et al. // Cancer Res. – 2001.– 61 (13). – P. 5024-5027.