

Трансформирующий фактор роста бета-1 в онкогенезе аденокарциномы легкого человека

В.Е. Шевченко¹, И.С. Брюховецкий^{2,3}, З.Н. Никифорова¹, С.В. Ковалев⁴, И.А. Кудрявцев¹, Н.Е. Арноцкая¹

¹НИИ канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²Школа биомедицины ФГАОУ ВПО «Дальневосточный федеральный университет»; Россия, 690091 Владивосток, ул. Суханова, 8;

³ФГБУН «Национальный научный центр морской биологии» Дальневосточного отделения РАН; Россия, 690059 Владивосток, ул. Пальчевского, 17;

⁴химический факультет ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»; Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3, ГСП-1

Контакты: Валерий Евгеньевич Шевченко vshev2015@yandex.ru

Введение. Трансформирующий фактор роста бета-1 (transforming growth factor beta 1, TGF- β 1) является одним из наиболее важных тканевых факторов, секретируемых при развитии эпителиальных опухолей. Повышенная экспрессия TGF- β 1 в злокачественных опухолях легких способствует ангиогенезу, супрессии иммунной системы, а также выживанию раковых клеток, увеличивая их рост, миграцию, инвазию.

Цель работы – изучение молекулярных механизмов действия TGF- β 1 на клетки A549 аденокарциномы легкого человека методом протеомной масс-спектрометрии высокого разрешения.

Результаты. Идентифицированы некоторые внутриклеточные сигнальные пути, ответственные за участие TGF- β 1 в онкогенезе немелкоклеточного рака легкого и включающие, в том числе, дифференциально экспрессированные белки семейств куллинов, онкогенов ETS, диацелаз гистонов, циклинзависимых киназ, сигнального пути фосфатидилинозитол-3-киназы (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K).

Заключение. Установлены важные закономерности, которые могут быть использованы при разработке новых подходов для обнаружения кандидатных маркеров метастазирования рака легкого и потенциальных мишеней для терапии этого заболевания.

Ключевые слова: трансформирующий фактор роста бета-1, аденокарцинома легкого, протеом, масс-спектрометрия, эпителиально-мезенхимальный переход

DOI: 10.17650/2313-805X-2017-4-3-67-74

The transforming growth factor beta-1 in the oncogenesis of human lung adenocarcinoma

V.E. Shevchenko¹, I.S. Bryukhovetskiy^{2,3}, Z.N. Nikiforova¹, S.V. Kovalev⁴, I.A. Kudryavtsev¹, N.E. Arnotskaya¹

¹Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

²Biomedicine School, Far Eastern Federal University; 8 Sukhanova St., Vladivostok 690091, Russia;

³National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences; 17 Pal'chevskogo St., Vladivostok 690059, Russia;

⁴Department of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University; GSP-1, Build. 3, 1 Leninskie Gory, Moscow 119991, Russia

Background. The transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) is one of the most important tissue factors secreted by the development of epithelial tumors. Increased expression of TGF- β 1 in lung tumors promotes cancer cells survival enhancing their growth, migration, invasion, angiogenesis, immune system suppression.

Objective: to study molecular mechanisms of TGF- β 1 action on A549 human lung adenocarcinoma cells by means of proteomic high-resolution mass spectrometry.

Results. Intracellular signaling pathways responsible for the involvement of TGF- β 1 in the oncogenesis of non-small cell lung cancer have been found, which include the differential expressed proteins of the families of cullin, ETS oncogenes, histone diacetylases, cyclin-dependent kinases, and the signaling pathway phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K).

Conclusions. Important patterns are determined that could be used for the development of new approaches for detection of lung cancer metastasis candidate markers and potential therapy targets of this disease.

Key words: transforming growth factor beta 1, lung adenocarcinoma, proteome, mass-spectrometry, epithelial-mesenchymal transition

Введение

Рак легкого (РЛ) занимает одно из первых мест в структуре заболеваемости и смертности от злокачественных опухолей во всем мире [1, 2]. Немелкоклеточный РЛ (НМРЛ) является основным гистологическим подтипом (~80 %) этого заболевания и часто коррелирует с метастазированием опухоли. При НМРЛ метастазы в лимфатические узлы и инвазия опухолевых клеток в соседние органы считаются наиболее важными показателями неблагоприятного прогноза [3]. Поэтому в последнее время уделяется повышенное внимание изучению сигнальных путей, вовлеченных в процесс метастазирования РЛ. Лучшее понимание молекулярных механизмов онкогенеза РЛ, идентификация молекулярных детерминант и маркеров метастатической активности раковых клеток в конечном счете обеспечат новые и эффективные методы лечения этого заболевания.

Несмотря на то что многие исследователи изучали генетические и молекулярные особенности РЛ для разработки более совершенных методов лечения, терапия РЛ по-прежнему остается сложной проблемой из-за взаимодействия между раковыми клетками и окружающей микросредой. Клетки РЛ, как и некоторые другие трансформированные клетки, часто подвергаются эпителиально-мезенхимальному переходу (ЭМП), иногда при участии фибробластов [4]. При ЭМП эпителиальные клетки теряют свои межклеточные контакты и апикальную базальную полярность, реорганизуют свой цитоскелет, секретируют протеины внеклеточного матрикса, и, таким образом, трансдифференцируются в мезенхимальные подвижные клетки [5].

Индукция ЭМП приводит к изменению пластичности в архитектуре эпителиальных тканей и метастатической инвазивности многих карцином, однако до конца его роль остается неясной. Недавние исследования связывают ЭМП с генерацией опухолевых стволовых клеток [6]. Стромальные клетки РЛ секретируют такие молекулы, как трансформирующий фактор роста бета 1 (transforming growth factor beta 1, TGF- β 1), которые вызывают ЭМП в опухолевых клетках, облегчая их инвазию, стволовость и метастазирование. TGF- β 1 — один из наиболее важных тканевых факторов, секретируемых при развитии эпителиальных опухолей. Он может вызывать прогрессию и метастазирование опухоли по аутокринному механизму, подавляя иммунитет, усиливая ангиогенез и деградацию внеклеточного матрикса [7, 8]. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что активация TGF- β 1-пути является одной из основных причин неблагоприятного прогноза [9]. Показано, что у больных РЛ повышены уровни TGF- β 1 в плазме крови как исходные, так и после лучевой терапии [10].

Свои различные эффекты TGF- β 1 осуществляет через сложную сеть лиганд-рецепторных взаимодействий, проводящих соответствующие сигналы. В кан-

церогенезе TGF- β 1 может выполнять двойную роль: в зависимости от стадии и типа опухоли он действует как супрессор опухоли или как канцерогенный фактор. Такое переключение от опухолевой супрессии к онкогенной активности также известно как «парадокс TGF- β » [11]. Несмотря на заметный прогресс в изучении TGF- β -сигнального пути, его роль в онкогенезе РЛ недостаточно ясна. Существующие в настоящее время данные указывают на важную роль TGF- β -сигнального пути на поздних этапах развития опухолевого процесса при РЛ, включая метастазирование, и делают его потенциальным кандидатом для таргетной терапии.

Цель работы — изучение молекулярных механизмов действия TGF- β 1 на линию клеток A549 аденокарциномы легкого человека методом протеомной масс-спектрометрии высокого разрешения. Впервые идентифицирован ряд внутриклеточных сигнальных путей, ответственных за участие TGF- β 1 в онкогенезе НМРЛ, что позволило обнаружить новые потенциальные маркеры метастазирования, мишени для таргетной терапии РЛ, часть из которых в перспективе может быть провалидирована и использована в практической медицине при разработке новых подходов для диагностики и терапии НМРЛ — одного из наиболее тяжелых онкологических заболеваний.

Экспериментальная часть

Клеточные культуры. Клетки линии A549 аденокарциномы легкого человека (American Type Culture Collection, США) культивировали в пластиковых флаконах 75 см² (Corning Costar, США) при температуре 37 °С в увлажненной атмосфере с 5 % CO₂ в среде RPMI-1640 с глутамином, с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, пенициллина (100 ед/мл) и стрептомицина (100 мкг/мл). При достижении 70 % монослоя при смене среды в контрольные флаконы с клетками добавляли 75 мкл фосфатного буферного раствора (ФБР), в опытные флаконы вносили в том же объеме TGF- β 1 в ФБР в концентрации 5 нг/мл и инкубировали в течение 72 ч. Клетки снимали раствором Версена (1 мл) и дважды отмывали ФБР (1 мл) центрифугированием при 1500 об/мин в течение 15 мин. Все клеточные линии выращивали в 3 экземплярах, независимо обрабатывали и анализировали.

Подготовка образцов для масс-спектрометрического анализа. Трипсинолиз высушенных лизатов проводили по ранее описанной методике [12]. По 4 мкл растворов полученных пептидов анализировали масс-спектрометрически для контроля проведения трипсинолиза [12]. По окончании реакции содержимое пробирок упаривали досуха при температуре 30 °С на центрифужном испарителе CentriVar (Labconco, США), а затем подвергали лиофильной сушке в течение ночи для полного удаления бикарбоната аммония.

Триптические пептиды растворяли в подвижной фазе А (30 % ацетонитрила (ACN), 70 % воды, 0,1 % муравьиной кислоты, pH 2,7) с таким расчетом, чтобы в 20 мкл раствора содержалось 100 мкг общего белка, и разделяли на хроматографе Dionex Ultimate 3000 (Нидерланды), снабженном коллектором фракций, на катионообменной колонке MIC-10-CP (материал Poros 10S, 1 мм × 10 см, Dionex) [12]. Полученные 24 фракции упаривали досуха при температуре 30 °С на центрифужном испарителе и перерастворяли в 100 мкл 0,1 % водного раствора муравьиной кислоты.

Масс-спектрометрический анализ. Анализ триптических пептидов проводили на нанопоточном хроматографе Dionex Ultimate 3000 (Нидерланды), соединенном с масс-спектрометром LTQ Orbitrap XL (Thermo, США) и снабженном электроспрейным источником ионизации. Хроматографирование пептидов осуществляли на колонке Acclaim C18 PepMap100 (75 мкм × 150 мм, размер зерна 3 мкм, Dionex), снабженной предколонкой Acclaim C18 PepMap (300 мкм × 5 мм, размер зерна 5 мкм). Масс-спектры регистрировали в режиме положительных ионов в диапазоне m/z 300–2000 Да [12].

Для идентификации белков использовали программу MaxQuant v1.5.2.8. Количественный расчет проводили методом *label-free* (без метки) для всех обнаруженных пептидов. Таблицу полученных белков обрабатывали в программе Perseus v1.5.1.6 для аннотирования и удаления белков-контаминантов и ложноположительных идентификаций, а также для определения статистической значимости различий в уровнях белков, полученных методом *label-free*. Значимыми считали различия при уровне достоверности $p < 0,05$ для парного t -критерия Стьюдента.

Результаты

Как было сказано, в работе использовали *label-free* количественный протеомный метод нано-ВЭЖХ-МС/МС для детектирования и сравнения дифференциально экспрессированных белков (ДЭБ) в лизатах линии клеток аденокарциномы легкого человека A549 до и после обработки их TGF- β 1. Анализ триптических пептидов по их МС/МС-спектрам с помощью программного пакета MaxQuant идентифицировал 2402 протеина по 15 597 (13 246 уникальным) пептидам при сравнении с данными базы SwissProt_human и ложным уровнем обнаружения (false discovery rate, FDR) 1 % для тройных повторов 2 видов образцов. Из них 2209 белков идентифицировали по 15 090 (12 764 уникальных) пептидам в контрольных клетках A549, 2135 — по 14 898 (12 582 уникальных) пептидам в клетках A549 после стимуляции TGF- β 1. Для всех линий клеток ~92 % белков идентифицировали по 2 и более пептидам. Коэффициент корреляции Пирсона для данных от образцов клеток A549 до и после стимуляции TGF- β 1 изменялся от 0,894 до 0,960.

Идентифицированные протеины показали высокий процент перекрытия для 2 клеточных популяций.

Во всех клеточных лизатах детектировались 1942 белка (81 % от 2402), 267 протеинов — только в контрольных клетках A549 и 193 протеина были уникальными для клеток A549 после их стимуляции TGF- β 1.

Статистически значимые ($p < 0,05$) изменения в экспрессии после обработки клеток TGF- β 1 зарегистрировали для 632 белков, из них 537 протеинов изменяли экспрессию более чем в 2 раза, 234 — увеличивали, а 303 — уменьшали. Эти белки рассматривали как дифференциально экспрессированные. Повышение экспрессии более чем на порядок наблюдали у 110 ДЭБ и более чем в 100 раз у 7 ДЭБ с индексами генов TRHDE, ZFR, EVI5, GVINP1, VPS8, MAP7D2, CNTRL. Снижение экспрессии после обработки TGF- β 1 клеток A549 более чем в 10 раз зарегистрировали у 30 белков, среди которых BRK1, PC4, CHD4, ASPH, SNRPG.

В табл. 1, построенной с использованием энциклопедии метаболических путей KEGG PATHWAY (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) и GO (Gene Ontology) биологических процессов, представлен список из 24 идентифицированных ДЭБ, участвующих в канцерогенезе. Как видно из табл. 1, при действии TGF- β 1 увеличивали экспрессию более чем в 2 раза 8 протеинов и снижали — 16. Обнаружены 11 протеинов, участвующих в онкогенезе НМРЛ, и 10 белков для мелкоклеточного РЛ. Из них 3 белка, кодируемые генами *CDK4*, *CDK6* и *PIK3CA*, относились к обеим гистологическим формам РЛ. При действии TGF- β 1 на клетки A549 экспрессия циклинзависимой киназы 4 и 6 (cyclin-dependent kinases 4, 6, CDK4, 6) снижалась в 5,51 и 4,94 раза соответственно, тогда как экспрессия каталитического альфа полипептида фосфатидилинозитол-3-киназы увеличивалась в 23,14 раза.

ДЭБ классифицировали в соответствии с их биологической ролью в клетке с помощью протеомно-геномной аналитической программы PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships, www.pantherdb.org). Число протеинов в каждой категории биологического процесса, увеличивающих (Up) или уменьшающих (Down) экспрессию в клетках A549 после их стимуляции TGF- β 1, представлена в табл. 2. В среднем отношение Up/Down составляет 0,72, указывая на то, что снижение экспрессии превалирует над ее повышением у идентифицированных белков практически во всех категориях биологических процессов при действии TGF- β 1. Только для процессов, связанных с ответом на стимулы и репродукцией, число Up- и Down-протеинов сравнивается.

Обсуждение

Цитокин TGF- β 1 играет важную роль в эпителиальном онкогенезе [13–16]. На ранних стадиях онкогенеза TGF- β 1, как правило, функционирует как опухолевый супрессор. На более поздних этапах, однако, когда опухоли растут и прогрессируют, TGF- β 1 синтезируется как раковыми, так и стромальными клетками в пределах микросреды опухоли как естественный

Таблица 1. Дифференциально экспрессированные белки, участвующие в канцерогенезе

Индекс гена	Белок	Немелкоклеточный рак легкого	Мелкоклеточный рак легкого	Участие в канцерогенезе	A549 + TGF-β1/A549
APPL1	Адапторный протеин взаимодействия фосфотирозина			+	0,27
BAX	Ассоциированный с BCL-2 протеин X			+	0,12
BIRC2	Бакуловирусный IAP протеин 2, содержащий повтор		+	+	2,24
CDC42	Белок 42 клеточного цикла деления			+	0,24
CUL2	Куллин 2			+	10,37
CDK4	Циклинзависимая киназа 4	+	+	+	0,18
CDK6	Циклинзависимая киназа 6	+	+	+	0,20
CRKL	Гомолог протеина онкогена <i>v-crk</i> вируса саркомы CT10			+	0,16
CTBP1	C-терминальный связывающий протеин 1			+	2,37
CTNNA1	Катенин альфа 1			+	0,10
ETS1	Гомолог 1 онкогена <i>v-ets</i> вируса эритробластоэза E26			+	69,41
HDAC1	Диацетилаза гистонов 1			+	0,08
HDAC2	Диацетилаза гистонов 2			+	0,22
ITGB1	Интегрин бета 1		+	+	0,14
MAPK1	Митогенактивируемая протеинкиназа 1	+		+	0,54
MAP2K2	Митогенактивируемая протеинкиназа 2	+		+	0,41
MSH2	mutS гомолог 2			+	2,62
NRAS	Гомолог онкогена RAS нейробластомы	+		+	0,43
PIK3CA	Каталитический альфа-полипептид фосфатидилинозитол-3-киназы	+	+	+	23,14
RHOA	Гомолог семейства RAS, член A			+	2,10
RAC1	Гуанозинтрифосфатсвязывающий протеин RAC1			+	0,54
TCEB1	Полипептид 1 фактора В элонгации транскрипции			+	4,10
TCEB2	Полипептид 2 фактора В элонгации транскрипции			+	0,40
TPR	Белок транслоцированной промоторной области			+	0,54

ответ на гипоксию и воспаление и может выступать в качестве мощного промоутера нескольких этапов метастатического процесса. К ним относятся не только локальная подвижность/инвазия и поступление раковых клеток в кровотоки (интравасация), но также их выход из кровеносных сосудов (экстравазация) и выживание в отдаленных органах [17–20]. Значение TGF-β1 в прогрессировании заболевания особенно велико в опухолях, в которых раковые клетки сохраняют основные компоненты TGF-β1-сигналинга (рак молочной железы (PMЖ) и РЛ) [14, 21]. Действительно, при НМРЛ – наиболее распространенном гистологическом подтипе РЛ с высоким уровнем смертности – увеличение экспрессии TGF-β1 коррелирует с прогрессией опухоли и плохой выживаемостью пациентов. Различные экспериментальные модельные

системы подтверждают мнение о прометастатической роли TGF-β1 в этих опухолях [22–25]. Тем не менее одной из основных нерешенных задач остается идентификация генов-мишеней для TGF-β1, которые управляют различными стадиями метастазирования, тем более что TGF-β1 модулирует экспрессию генов по-разному в зависимости от типа клеток [26, 27]. Несмотря на определенный прогресс в контексте метастазов PMЖ, гены и механизмы, которые опосредуют прометастатические эффекты TGF-β1 при НМРЛ, остаются в значительной степени неизвестными.

Как видно из табл. 1, TGF-β1 оказывает существенное влияние на экспрессию ряда белков, связанных с канцерогенезом, которые могут являться потенциальными мишенями для таргетной терапии РЛ. В частности, TGF-β1 модулирует экспрессию куллинов

Таблица 2. Число протеинов в каждой категории биологического процесса, увеличивающих или уменьшающих экспрессию в клетках A549 после их стимуляции TGF- β 1

Категория биологического процесса	Онтология генов (Gene Ontology, GO)	Число протеинов	Число протеинов, увеличивающих экспрессию (Up)	Число протеинов, снижающих экспрессию (Down)	Up/Down
Метаболический	GO:0008152	337	132	205	0,64
Клеточный	GO:0009987	225	92	133	0,69
Биологическая регуляция	GO:0065007	94	42	52	0,81
Локализация	GO:0051179	86	34	52	0,65
Организация или биогенез клеточных компонентов	GO:0071840	80	28	52	0,54
Развитие	GO:0032502	70	28	42	0,67
Отклик на стимулы	GO:0050896	36	18	18	1,00
Многоклеточные организмы	GO:0032501	37	15	22	0,68
Иммунные	GO:0002376	27	12	15	0,80
Апоптотический	GO:0006915	16	6	10	0,60
Репродуктивный	GO:0000003	8	4	4	1,00
Адгезия	GO:0022610	9	3	6	0,50

(cullins) – семейство гидрофобных белков, служащих скэффолдом для убиквитинлигаз (E3). Они в сочетании с RING-белками образуют куллин-RING-убиквитинлигазы (CRL), которые играют важную роль во многих клеточных процессах. Нами идентифицированы 5 (CUL1, CUL2, CUL3, CUL4, CUL5) из 8 членов этого семейства. У человека функциональные изменения этого семейства убиквитинлигаз связаны с заболеваниями мышц, метаболическими нарушениями и раком [28]. Наиболее известным субстратом, распознающим рецептор CRL2, является опухолевый супрессор – белок VHL, который мутирует при синдроме фон Хиппеля–Линдау (VHL) [29]. При действии TGF- β 1 (см. табл. 1) экспрессия CUL2 увеличивалась в 10,37 раза. В последнее время появилось значительное число исследований, проливающих свет на биологические функции CUL3 E3-лигазы, которая регулирует прогрессирование опухолевого процесса и терапевтический ответ. В частности, Keap1, KLHL20 и SPOP являются наиболее известными субстратными адаптерами для CUL3 при ее воздействии на различные виды рака. Эти 3 белка опосредуют CUL3-зависимое убиквитинирование ряда субстратов при инициации опухолевого процесса, его прогрессировании и терапевтическом ответе [30]. Нами отмечено увеличение экспрессии CUL3 в 5,22 раза.

ETS1 входит в семейство онкогенов ETS, члены которого обладают характерным ДНК-связывающим доменом (домен ETS) из 85 аминокислот [31]. Белок ETS1 контролирует уровни экспрессии множества генов, включая факторы транскрипции, протеазы, гены

клеточного цикла, гены, регулирующие апоптоз, цитокины и факторы роста [32]. Повышенная активность ETS1 наблюдалась при РМЖ, РЛ, раке яичников, ободочной и прямой кишки и меланоме [33–37]. ETS1 сверхэкспрессируется при инвазивном РМЖ и коррелирует с его плохим прогнозом [38]. Высокая экспрессия ETS1 способствует миграции раковых клеток, инвазии и анкернезависимому росту, в то же время низкая экспрессия ETS1 снижала адгезию клеток HeLa [39]. TGF- β 1 увеличивал экспрессию ETS1 в клетках A549 в 69,41 раза (см. табл. 1).

Дерегуляция сигналинга фосфатидилинозитол-3-киназы (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) имеет решающее значение для многих злокачественных опухолей человека, несмотря на то, что для нормальной пролиферации клеток требуется адекватная функциональность этого каскада. Хотя ряд ингибиторов PI3K-пути находятся на клинических испытаниях или одобрены для противоопухолевой терапии, все еще неясна роль функциональной активности членов этого каскада при конкретных злокачественных опухолях. При РЛ PI3K-путь часто aberrантно активируется мутацией генов, кодирующих белки EGFR, KRAS и PIK3CA [40]. При действии TGF- β 1 на клетки A549 (см. табл. 1) наблюдалось значительное увеличение (в 23,14 раза) экспрессии протеина PIK3CA, что может указывать на тесную взаимосвязь TGF- β 1 с PI3K-сигнальными путями и должно учитываться при выборе мишеней для таргетной терапии НМРЛ.

При многих видах рака положительно регулируются несколько генов, связанных с онкогенезом

и опухолевой прогрессией, а супрессорные гены подавляются. Одним из факторов, регулирующих эти процессы, является экспрессия генов посттрансляционной модификации гистонов. Метилирование и ацетилирование гистонов — хорошо известные посттрансляционные модификации. В последнее время повышенное внимание уделяется метилированию и ацетилированию гистонов при лечении рака [41, 42]. Диацетилазы гистонов (histone deacetylases, HDACs) часто сверхэкспрессированы при онкологических заболеваниях, в последние годы они стали основной терапевтической мишенью [43]. Повышенная экспрессия HDACs может привести к глушению транскрипции генов и aberrантной транскрипции из-за измененной экспрессии/мутации генов, кодирующих гистонацетилаз (HAT), HDAC-ферменты или их связывающих партнеров, и тесно сопряжена с канцерогенезом. Это происходит при многих злокачественных опухолях у человека, указывая на то, что активность aberrантного эпигенетического ацетилирования связана с развитием рака [44–46]. Полагают, что последовательные стадии ЭМП и мезенхимально-эпителиального перехода, происходящие в процессе опухолевой прогрессии, могут быть обратимыми и связаны с эпигенетическими изменениями.

В нескольких исследованиях отмечен эффект ингибиторов HDAC на SMAD4. А. Kaimori и соавт. показали, что ингибирование гистонацетилазы подавляет TGF- β -индуцированный ЭМП в гепатоцитах путем ингибирования транслокации SMAD4 в ядро [47]. С. L. Chung и соавт. показали, что ингибитор HDAC — м-карбоксихидроксиаминовая кислота — ингибирует транслокацию в ядро SMAD4 в плевральных мезотелиальных клетках человека [48]. Анализ полученных нами данных неожиданно выявил снижение экспрессии HDAC1 (в 12,87 раза), HDAC2 (в 4,64 раза) и уровня HAT1 (в 3,06 раза) при действии TGF- β 1 на клетки A549. Полученный эффект требует дополнительного исследования.

CDK — группа белков, регулируемых циклином и циклиноподобными молекулами. Большинство CDK участвуют в смене фаз клеточного цикла, регулируют транскрипцию и процессинг матричной (мРНК). CDK — серин/треониновые киназы, фосфорилируют соответствующие аминокислотные остатки в белках. Известны несколько CDK, каждая из которых активируется одним или более циклинами и иными подобными молекулами. Aberrантная регуляция клеточного цикла является отличительной чертой рака [49]. Активность CDK4/6 дерегулирована в результате различных генетических изменений во многих злокачественных опухолях человека. Они включают мутации генов *CDK4* и *CDK6*, амплификацию генов, кодирующих циклины D-типа, делецию или сайленсинг *CDKN2A/B*-генов, кодирующих INK4-ингибиторы p16 и p15 [50]. Такое дерегулирование имеет решающее значение для различных процессов онкогенной

трансформации, на что указывает высокая активность CDK4/6 во многих раковых клетках [51]. Ранее установлено, что CDK4/6-ингибитор PD-0332991 увеличивал SMAD-транскрипционную активность, индуцировал ЭМП, усиливал экспрессию метастатических генов [52]. При инициации ЭМП в клетках A549 TGF- β 1 наблюдалось снижение активности CDK4 и CDK6 в 5,51 и 4,94 раза соответственно (см. табл. 1). Экспрессия CDK5 и CDK9 также снижалась в 1,50 и 3,43 раза соответственно, тогда как уровни ингибитора CDK1 возрастали в 1,59 раза, а протеина 1, ассоциированного с CDK2, — в 8,53 раза. Эти данные указывают на то, что ингибирование активности CDK4/6 может частично активировать TGF- β -сигнальный каскад и способствовать протеканию процесса ЭМП.

Полипептид 1 фактора B (SII) элонгации транскрипции (transcription elongation factor B (SII), polypeptide 1; TCEB1) выполняет несколько функций в клетке. Он является частью комплекса Elongin (SIII), который работает как активатор транскрипции [53]. В цитоплазме клеток TCEB1 входит в состав белкового комплекса VHL, таргетирующего онкоген *HIF-1 α* [54]. S. E. Jalava и соавт. показали, что уменьшение экспрессии TCEB1 приводило к снижению инвазии и метастазирования клеток рака предстательной железы [55]. При действии TGF- β 1 на клетки A549 мы наблюдали увеличение его уровней в 4,1 раза (см. табл. 1). Одновременно отмечали повышение экспрессии в 2,46 раза ADAM9, опосредующего его эффект [55].

Цинк-пальцевые белки, кодируемые с участием протеина, связывающего цинк-пальцевую РНК (ZFR), играют важную роль в связывании ДНК и регулировании процессов роста и развития [56]. Человеческий ZFR, по-видимому, участвует в регулировании альтернативного сплайсинга пре-мРНК [56]. Нокаут ZFR инициирует арест клеточного цикла в фазе G0/G1 и супрессирует миграцию и инвазию клеток PANC-1 рака поджелудочной железы [56]. Действие TGF- β 1 вызывает гиперэкспрессию (в 339,82 раза) ZFR в клетках A549. Одновременно зарегистрировано увеличение уровней цинк-пальцевого белка 578 (ZNF578) в 25,11 раза. Оба белка могут рассматриваться как потенциальные мишени для таргетной терапии НМРЛ.

Связь протеина сайта 5 экотропной вирусной интеграции (Evi5) с регуляцией клеточного цикла и миграцией клеток предполагает его участие в патологии некоторых заболеваний. Однако прямые доказательства роли Evi5 в онкогенезе или подавлении туморогенеза пока отсутствуют [57]. Инкубация TGF- β 1 с клетками A549 приводит к увеличению экспрессии Evi5 в 213,09 раза, что указывает на его тесную связь с TGF- β 1-сигналингом и требует дальнейшего изучения.

Заключение

Методом протеомной масс-спектрометрии высокого разрешения изучены молекулярные механизмы действия TGF- β 1 на клетки A549 аденокарци-

номы легкого человека. Впервые обнаружены не описанные ранее сигнальные пути, ответственные за участие TGF- β 1 в онкогенезе НМРЛ, которые включают ДЭБ семейств куллинов, онкогенов ETS, диацелаз гистонов, CDK, цинк-пальцевых белков. Особый интерес представляют белки ZFR и Evi5, экспрессия которых в клетках A549 под действием

TGF- β 1 увеличивается в сотни раз. Требуется дополнительное исследование для понимания их роли в онкогенезе РЛ. Полученные нами данные могут использоваться при разработке новых подходов для обнаружения кандидатных маркеров метастазирования НМРЛ и потенциальных мишеней для терапии этого заболевания.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Siegel R., Naishadham D., Jemal A. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2012;62(1):10–29.
- Liotta L.A., Steeg P.S., Stetler-Stevenson W.G. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 1991;64(2):327–36.
- Ganti A.K., Huang C.H., Klein M.A. et al. Lung cancer management in 2010. *Oncology (Williston Park)* 2011;25(1):64–73.
- Kojima Y., Acar A., Eaton E.N. et al. Autocrine TGF-beta and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(46):20009–14.
- Kalluri R., Weinberg R.A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009;119(6):1420–8.
- Morel A.P., Lievre M., Thomas C. et al. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One* 2008;3(8):e2888.
- Miyazono K., Ehata S., Koinuma D. Tumor-promoting functions of transforming growth factor- β in progression of cancer. *Ups J Med Sci* 2012;117(2):143–52.
- Ikushima H., Todo T., Ino Y. et al. Autocrine TGF-beta signaling maintains tumorigenicity of glioma-initiating cells through Sry-related HMG-box factors. *Cell Stem Cell* 2009;5(5):504–14.
- Zhao L., Ji W., Zhang L. et al. Changes of circulating transforming growth factor-beta1 level during radiation therapy are correlated with the prognosis of locally advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2010;5(4):521–5.
- Dancea H.C., Shareef M.M., Ahmed M.M. Role of radiation-induced TGF-beta signaling in cancer therapy. *Mol Cell Pharmacol* 2009;1(1):44–56.
- Rahimi R.A., Leof E.B. TGF-beta signaling: a tale of two responses. *J Cell Biochem* 2007;102(3):593–608.
- Шевченко В.Е., Ковалев С.В., Арноцкая Н.Е. и др. Молекулярные детерминанты действия трансформирующего фактора роста бета-1 на клетки глиобластомы человека. *Успехи молекулярной онкологии* 2016;3(2):50–9.
- [Shevchenko V.E., Kovalev S.V., Arnotskaya N.E. et al. Molecular determinants of transforming growth factor beta-1 action on human glioblastoma cells. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2016;3(2):50–9. (In Russ.)].
- Derynck R., Akhurst R.J., Balmain A. TGF- β signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet* 2001;29(2):117–29.
- Elliott R.L., Blobel G.C. Role of transforming growth factor b in human cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:2078–93.
- Padua D., Massague J. Roles of TGF- β in metastasis. *Cell Res* 2009;19:89–102.
- Jakowlew S.B. Transforming growth factor- β in lung cancer, carcinogenesis, and metastasis. In: *The tumor microenvironment*. Ed. R.G. Bagley. 2010. Pp. 633–671.
- Ma C., Rong Y., Radloff D.R. et al. Extracellular matrix protein big-h3/TGFBI promotes metastasis of colon cancer by enhancing cell extravasation. *Genes Dev* 2008;22(3):308–21.
- Giampieri S., Manning C., Hooper S. et al. Localized and reversible TGFbeta signalling switches breast cancer cells from cohesive to single cell motility. *Nat Cell Biol* 2009;11(11):1287–96.
- Labelle M., Begum S., Hynes R.O. Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis. *Cancer Cell* 2011;20(5):576–90.
- Yuan J.H., Yang F., Wang X. et al. A long noncoding RNA activated by TGF- β promotes the invasion-metastasis cascade in hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell* 2014;25(5):666–81.
- Hasegawa Y., Takanashi S., Kanehira Y. et al. Transforming growth factor- β 1 level correlates with angiogenesis, tumor progression, and prognosis in patients with non-small cell lung carcinoma. *Cancer* 2001;91(5):964–71.
- Toonkel R.L., Borczuk A.C., Powell C.A. TGF- β signaling pathway in lung adenocarcinoma invasion. *J Thorac Oncol* 2010;5(2):153–7.
- Vazquez P.F., Carlini M.J., Daroqui M.C. et al. TGF- β specifically enhances the metastatic attributes of murine lung adenocarcinoma: implications for human non-small cell lung cancer. *Clin Exp Metastasis* 2013;30(8):993–1007.
- Massague J. TGF- β signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012;13(10):616–30.
- Michl P., Ramjaun A.R., Pardo O.E. et al. CUTL1 is a target of TGF- β signaling that enhances cancer cell motility and invasiveness. *Cancer Cell* 2005;7(6):521–32.
- Gregory P.A., Bracken C.P., Smith E. et al. An autocrine TGF- β /ZEB/miR-200 signaling network regulates establishment and maintenance of epithelial-mesenchymal transition. *Mol Biol Cell* 2011;22(10):1686–98.
- Shibue T., Brooks M.W., Weinberg R.A. An integrin-linked machinery of cytoskeletal regulation that enables experimental tumor initiation and metastatic colonization. *Cancer Cell* 2013;24(4):481–98.
- Genschik P., Sumara I., Lechner E. The emerging family of CULLIN3-RING ubiquitin ligases (CRL3s): cellular functions and disease implications. *EMBO J* 2013;32(17):2307–20.
- Linehan W.M., Lerman M.I., Zbar B. Identification of the von Hippel-Lindau (VHL) gene. Its role in renal cancer. *JAMA* 1995;273:564–70.
- Chen H.Y., Chen R.H. Cullin 3 ubiquitin ligases in cancer biology: functions and therapeutic implications. *Front Oncol* 2016;6:113.
- Laudet V., Hänni C., Stéhelin D. Molecular phylogeny of the ETS gene family. *Oncogene* 1999;18(6):1351–9.
- Sementchenko V.I., Watson D.K. Ets target genes: past, present and future. *Oncogene* 2000;19(55):6533–48.
- Fujimoto J., Aoki I., Toyoki H. et al. Clinical implications of expression of ETS-1 related to angiogenesis in metastatic lesions of ovarian cancers. *Oncology* 2004;66(5):420–8.
- Yamaguchi E., Nakayama T., Nanashima A. et al. Ets-1 proto-oncogene as a potential predictor for poor prognosis of lung adenocarcinoma. *Tohoku J Exp Med* 2007;213(1):41–50.
- Rothhammer T., Hahne J.C., Florin C. et al. The Ets-1 transcription factor is involved in the development and

- invasion of malignant melanoma. *Cell Mol Life Sci* 2004;61(1):118–28.
36. Nakayama T., Ito M., Ohtsuru A. et al. Expression of the Ets-1 proto-oncogene in human colorectal carcinoma. *Mod Pathol* 2001;14(5):415–22.
 37. Span P.N., Manders P., Heuvel J.J. et al. Expression of the transcription factor Ets-1 is an independent prognostic marker for relapse-free survival in breast cancer. *Oncogene* 2002;21(55):8506–9.
 38. Puzovic V., Brcic I., Ranogajec I., Jakic-Razumovic J. Prognostic values of ETS-1, MMP-2 and MMP-9 expression and co-expression in breast cancer patients. *Neoplasma* 2014;61(4):439–46.
 39. Hahne J.C., Okuducu A.F., Kaminski A. et al. Ets-1 expression promotes epithelial cell transformation by inducing migration, invasion and anchoragein-dependent growth. *Oncogene* 2005;24(34):5384–8.
 40. Stamatkin C., Ratermann K.L., Overley C.W. et al. Inhibition of class IA PI3K enzymes in non-small cell lung cancer cells uncovers functional compensation among isoforms. *Cancer Biol Ther* 2015;16(9):1341–52.
 41. Sui X., Zhu J., Zhou J. et al. Epigenetic modifications as regulatory elements of autophagy in cancer. *Cancer Lett* 2015;360(2):106–13.
 42. Rodrigues M.F., Carvalho É., Pezzuto P. et al. Reciprocal modulation of histone deacetylase inhibitors sodium butyrate and trichostatin a on the energy metabolism of breast cancer cells. *J Cell Biochem* 2015;116(5):797–808.
 43. Song J., Noh J.H., Lee J.H. et al. Increased expression of histone deacetylase 2 is found in human gastric cancer. *APMIS* 2005;113(4):264–8.
 44. Brock M.V., Hooker C.M., Ota-Machida E. et al. DNA methylation markers and early recurrence in stage I lung cancer. *N Engl J Med* 2008;358(11):1118–28.
 45. Sterlacci W., Tzankov A., Veits L. et al. A comprehensive analysis of p16 expression, gene status, and promoter hypermethylation in surgically resected non-small cell lung carcinomas. *J Thorac Oncol* 2011;6(10):1649–57.
 46. Ibanez de Caceres I., Cortes-Sempere M., Moratilla C. et al. IGFBP-3 hypermethylation-derived deficiency mediates cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 2010;29(11):1681–90.
 47. Kaimori A., Potter J.J., Choti M. et al. Histone deacetylase inhibition suppresses the transforming growth factor beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition in hepatocytes. *Hepatology* 2010;52(3):1033–45.
 48. Chung C.L., Sheu J.R., Chen W.L. et al. Histone deacetylase inhibitor mcarboxycinnamic acid bis-hydroxamide attenuates plasminogen activator inhibitor-1 expression in human pleural mesothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2012;46(4):437–45.
 49. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144(5):646–74.
 50. Ortega S., Malumbres M., Barbacid M. Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2002;1602(1):73–87.
 51. Choi Y.J., Li X., Hydbring P. et al. The requirement for cyclin d function in tumor maintenance. *Cancer Cell* 2012;22(4):438–51.
 52. Schutte M., Hruban R.H., Hedrick L. et al. DPC4 gene in various tumor types. *Cancer Res* 1996;56(11):2527–30.
 53. Aso T., Lane W.S., Conaway J.W., Conaway R.C. Elongin (SIII): a multisubunit regulator of elongation by RNA polymerase II. *Science* 1995;269(5229):1439–43.
 54. Cockman M.E., Masson N., Mole D.R. et al. Hypoxia inducible factor-alpha binding and ubiquitylation by the von Hippel–Lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem* 2000;275(33):25733–41.
 55. Jalava S.E., Porkka K.P., Rauhala H.E. et al. TCEB1 promotes invasion of prostate cancer cells. *Int J Cancer* 2009;124(1):95–102.
 56. Zhao X., Chen M., Tan J. Knockdown of ZFR suppresses cell proliferation and invasion of human pancreatic cancer. *Biol Res* 2016;49(1):26.
 57. Lim Y.S., Tang B.L. The Evi5 family in cellular physiology and pathology. *FEBS Lett.* 2013; 587(12):1703–10.