

## Трансформирующий фактор роста бета-1 в онкогенезе аденокарциномы легкого человека

В.Е. Шевченко<sup>1</sup>, И.С. Брюховецкий<sup>2,3</sup>, З.Н. Никифорова<sup>1</sup>, С.В. Ковалев<sup>4</sup>, И.А. Кудрявцев<sup>1</sup>, Н.Е. Арноцкая<sup>1</sup>

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

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

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

<sup>4</sup>химический 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- $\beta$ 1) является одним из наиболее важных тканевых факторов, секретируемых при развитии эпителиальных опухолей. Повышенная экспрессия TGF- $\beta$ 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- $\beta$ 1 на клетки A549 аденокарциномы легкого человека методом протеомной масс-спектрометрии высокого разрешения.

**Результаты.** Идентифицированы некоторые внутриклеточные сигнальные пути, ответственные за участие TGF- $\beta$ 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. Shevchenko<sup>1</sup>, I.S. Bryukhovetskiy<sup>2,3</sup>, Z.N. Nikiforova<sup>1</sup>, S.V. Kovalev<sup>4</sup>, I.A. Kudryavtsev<sup>1</sup>, N.E. Arnotskaya<sup>1</sup>

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

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

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

<sup>4</sup>Department 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- $\beta$ 1) is one of the most important tissue factors secreted by the development of epithelial tumors. Increased expression of TGF- $\beta$ 1 in lung tumors promotes cancer cells survival enhancing their growth, migration, invasion, angiogenesis, immune system suppression.

**Objective:** to study molecular mechanisms of TGF- $\beta$ 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- $\beta$ 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 diacylases, 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- $\beta$ 1), которые вызывают ЭМП в опухолевых клетках, облегчая их инвазию, стволовость и метастазирование. TGF- $\beta$ 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- $\beta$ 1-пути является одной из основных причин неблагоприятного прогноза [9]. Показано, что у больных РЛ повышены уровни TGF- $\beta$ 1 в плазме крови как исходные, так и после лучевой терапии [10].

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

церогенезе TGF- $\beta$ 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- $\beta$ » [11]. Несмотря на заметный прогресс в изучении TGF- $\beta$ -сигнального пути, его роль в онкогенезе РЛ недостаточно ясна. Существующие в настоящее время данные указывают на важную роль TGF- $\beta$ -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- $\beta$ 1 на линию клеток A549 аденокарциномы легкого человека методом протеомной масс-спектрометрии высокого разрешения. Впервые идентифицирован ряд внутриклеточных сигнальных путей, ответственных за участие TGF- $\beta$ 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 см<sup>2</sup> (Corning Costar, США) при температуре 37 °С в увлажненной атмосфере с 5 % CO<sub>2</sub> 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- $\beta$ 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- $\beta$ 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- $\beta$ 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- $\beta$ 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- $\beta$ 1.

Статистически значимые ( $p < 0,05$ ) изменения в экспрессии после обработки клеток TGF- $\beta$ 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- $\beta$ 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- $\beta$ 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- $\beta$ 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- $\beta$ 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- $\beta$ 1. Только для процессов, связанных с ответом на стимулы и репродукцией, число Up- и Down-протеинов сравнивается.

### Обсуждение

Цитокин TGF- $\beta$ 1 играет важную роль в эпителиальном онкогенезе [13–16]. На ранних стадиях онкогенеза TGF- $\beta$ 1, как правило, функционирует как опухолевый супрессор. На более поздних этапах, однако, когда опухоли растут и прогрессируют, TGF- $\beta$ 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- $\beta$ 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- $\beta$ 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- $\beta$ 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- $\beta$ 1 на клетки A549 (см. табл. 1) наблюдалось значительное увеличение (в 23,14 раза) экспрессии протеина PIK3CA, что может указывать на тесную взаимосвязь TGF- $\beta$ 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 гистонацетилазотрансферазу (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 гистондеацетилазы подавляет TGF- $\beta$ -индуцированный ЭМП в гепатоцитах путем ингибирования транслокации SMAD4 в ядро [47]. С. L. Chung и соавт. показали, что ингибитор HDAC — м-карбоксихиннаминовая 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- $\beta$ 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- $\beta$ 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- $\beta$ -сигнальный каскад и способствовать протеканию процесса ЭМП.

Полипептид 1 фактора В (SII) элонгации транскрипции (transcription elongation factor В (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 $\alpha$*  [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- $\beta$ 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- $\beta$ 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- $\beta$ 1 с клетками A549 приводит к увеличению экспрессии Evi5 в 213,09 раза, что указывает на его тесную связь с TGF- $\beta$ 1-сигналингом и требует дальнейшего изучения.

### Заключение

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

номы легкого человека. Впервые обнаружены не описанные ранее сигнальные пути, ответственные за участие TGF- $\beta$ 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- $\beta$ 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- $\beta$  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- $\beta$ 1 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- $\beta$  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- $\beta$  in metastasis. *Cell Res* 2009;19:89–102.
- Jakowlew S.B. Transforming growth factor- $\beta$  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- $\beta$  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- $\beta$ 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- $\beta$  signaling pathway in lung adenocarcinoma invasion. *J Thorac Oncol* 2010;5(2):153–7.
- Vázquez P.F., Carlini M.J., Daroqui M.C. et al. TGF- $\beta$  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- $\beta$  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- $\beta$  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- $\beta$ /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.