

Молекулярные детерминанты действия трансформирующего фактора роста бета-1 на клетки глиобластомы человека

В.Е. Шевченко¹, С.В. Ковалев², Н.Е. Арноцкая¹, З.Н. Никифорова¹, И.А. Кудрявцев¹,
Е.А. Савченко³, И.С. Брюховецкий^{4,5}

¹НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24;

²химический факультет ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»; Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3, ГСП-1;

³ФГБУН «Институт биологии гена» РАН; Россия, 119334, Москва, ул. Вавилова, 34/5;

⁴Школа биомедицины ФГАОУ ВПО «Дальневосточный федеральный университет»; Россия, 690091, Владивосток, ул. Суханова, 8;

⁵ФГБУН «Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения РАН; Россия, 690059, Владивосток, ул. Пальчевского, 17

Контакты: Валерий Евгеньевич Шевченко vshev2015@yandex.ru

Введение. Повышенная экспрессия трансформирующего фактора роста бета-1 (transforming growth factor beta1, TGF-β1) в злокачественных опухолях головного мозга способствует выживанию опухолевых клеток, увеличивая их рост, миграцию, инвазию, ангиогенез, супрессию иммунной системы.

Цель работы — методом протеомной масс-спектрометрии высокого разрешения изучить молекулярные механизмы действия TGF-β1 на клетки U87 глиобластомы человека.

Результаты. Идентифицированы внутриклеточные сигнальные пути, ответственные за участие TGF-β1 в онкогенезе злокачественных глиом и включающие дифференциально экспрессированные белки плотных межклеточных контактов, фокальной адгезии, деацетаз гистонов, теплового шока, семейства S100.

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

Ключевые слова: трансформирующий фактор роста бета-1, мультиформная глиобластома, протеом, масс-спектрометрия, эпителиально-мезенхимальный переход, фокальная адгезия, плотные межклеточные контакты

DOI: 10.17650/2313-805X-2016-3-2-50—59

Molecular determinants of transforming growth factor beta-1 action on human glioblastoma cells

V.E. Shevchenko¹, S.V. Kovalev², N.E. Arnotskaya¹, Z.N. Nikiforova¹, I.A. Kudryavtsev¹, E.A. Savchenko³, I.S. Bryukhovetskiy^{4,5}

¹Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow, 115478, Russia;

²Department of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University; GSP-1, Build. 3, 1 Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russia;

³Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences; 34/5 Vavilova St., Moscow, 119334, Russia;

⁴Biomedicine School, Far Eastern Federal University; 8 Sukhanova St., Vladivostok, 690091, Russia;

⁵A. V. Zhirmunsky Institute of Sea Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences; 17 Pal'chevskogo St., Vladivostok, 690059, Russia

Background. Increased expression of transforming growth factor beta-1 (TGF-β1) in malignant brain tumors promotes cancer cells survival enhancing their growth, migration, invasion, angiogenesis, immune system suppression.

Objective is to study molecular mechanisms of TGF-β1 action on U87 human glioblastoma cells by means of proteomic high-resolution mass-spectrometry.

Results. We have identified intracell signal pathways responsible for TGF-β1 involvement in malignant gliomas oncogenesis including differential expressed proteins of tight cell junctions, focal adhesion, histone deacetylases, heat shock, S100 family.

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

Key words: transforming growth factor beta-1, glioblastoma multiforme, proteome, mass-spectrometry, epithelial-mesenchymal transition, focal adhesion, tight cell junctions

Введение

Мультиформная глиобластома (Glioblastoma Multiforme, GBM) — наиболее распространенная первичная высоко инвазивная глиальная опухоль головного мозга человека с крайне неблагоприятным прогнозом [1]. Выживаемость больных при использовании всех современных протоколов комплексного лечения составляет 6–12 мес после постановки диагноза из-за инфильтративной и агрессивной природы GBM [2]. Инвазия/инфильтрация опухолевых клеток и их пролиферация остаются главными причинами смерти больных злокачественными глиомами [3]. Поэтому в последнее время уделяется повышенное внимание изучению сигнальных путей, вовлеченных в развитие глиобластомы. Лучшее понимание молекулярных механизмов онкогенеза GBM в конечном счете должно привести к открытию новых терапевтических мишеней, которые обеспечат более эффективные методы лечения этого заболевания [4].

Среди многих сигнальных путей, связанных с глиомами, сигналинг с участием трансформирующего фактора роста бета (transforming growth factor beta, TGF- β) играет важную роль в регулировании поведения этих опухолей [5]. Сообщалось о повышенных уровнях TGF- β в сыворотке крови и опухолевой ткани пациентов со злокачественной глиомой, наблюдалась отчетливая корреляция повышенного уровня TGF- β со степенью злокачественности и распространенностью опухолевого процесса, плохим прогнозом для больных. Высказывается предположение о прямом участии этого сигнального пути в молекулярных механизмах, связанных со злокачественностью глиом [5]. Опубликованы данные о том, что TGF- β может вызывать прогрессию опухолевого процесса по аутокринному механизму [6].

TGF- β относится к цитокинам, которые участвуют в регуляции эмбрионального развития и гомеостаза ткани [7]. На клеточном уровне TGF- β влияет на такие процессы, как рост, выживание, дифференцировка, миграция клеток и активация иммунитета в зависимости от типа клеток и клеточного контекста. Свои действия TGF- β осуществляет через сложную сеть различных лигандов и рецепторов, проводящих соответствующие сигналы [7]. При раке сигнальный путь TGF- β выполняет как супрессорные, так и промотирующие функции. TGF- β считают опухолевым супрессором, поскольку он является мощным ингибитором пролиферации эпителиальных клеток, астроцитов и иммунцитов. Некоторые опухоли приобретают устойчивость к цитостатическому действию TGF- β в результате мутаций в отдельных элементах сигнального пути TGF- β . Определенные злокачественные опухоли, включая глиомы, селективно теряют способность TGF- β ингибировать пролиферацию, сохраняя другие их функции неизменными [7]. В таких опухолях TGF- β может вызывать пролиферацию, ангиогенез, инвазию, метастазирование и супрессию иммунитета. Таким образом, TGF- β играет двойную роль в канцерогенезе и, в зави-

симости от стадии и типа опухоли, он действует как супрессор опухоли или как канцерогенный фактор [8]. Такое переключение от опухолевой супрессии к онкогенной активности известно как «парадокс TGF- β » [9]. Несмотря на заметный прогресс в изучении сигнального пути TGF- β , его роль в онкогенезе глиом недостаточно ясна.

Особый интерес представляют данные о модуляции TGF- β эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП). Индукция ЭМП приводит к метастатической инвазии многих карцином, однако до конца его роль остается непонятной, особенно в случае глиобластом. Недавние исследования связывают ЭМП с генерацией опухолевых стволовых клеток [10]. Молекулярные механизмы TGF- β индукции ЭМП в глиобластомах мало изучены. Тем не менее представленные в настоящее время данные указывают на важную роль сигнального пути TGF- β на поздних этапах развития опухолевого процесса в глиомах, включая инвазию, и делают его потенциальным кандидатом для таргетной терапии.

В настоящей работе впервые методом протеомной масс-спектрометрии высокого разрешения изучали молекулярные механизмы действия TGF- β 1 на клетки U87 глиобластомы человека. Идентифицированы внутриклеточные сигнальные пути, ответственные за участие TGF- β 1 в онкогенезе злокачественных глиом и включающие дифференциально экспрессированные белки (ДЭБ) плотных межклеточных контактов (ПМК), фокальной адгезии, деацетаз гистонов (histone deacetylases, HDAC), теплового шока (heat shock proteins, HSP), семейства S100. Установлены важные закономерности, которые могут быть использованы при разработке новых подходов для обнаружения кандидатных маркеров метастазирования глиобластомы и потенциальных мишеней для терапии этого заболевания.

Экспериментальная часть

Реактивы. Для всех процедур использовали дистиллированную воду, очищенную и обессоленную с помощью Milli-Q (Millipore Corporation, США). Ацетонитрил (ACN) HPLC gradient grade был получен из Prolabo (США); 98–100 % муравьиная кислота (FA) — из Merck (США); гидрокарбонат аммония NH_4HCO_3 , дитиотреитол, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), трис-(2-карбоксиэтил)-фосфин (TCEP), трифторуксусная кислота (TFA) и мочевины — из Fluka (USA); 99,7 % уксусная кислота, 99,5 % 2,2,2-трифторэтанол (TFE), TGF- β 1, иодацетамид и трипсин, метилированный по лизинам — из SigmaAldrich (США); соляная кислота (чистая) и хлорид калия (KCl) (чистый) — из Химмед (Россия).

Клеточные культуры. Клетки линии U87 культивировали при температуре +37 °C в увлажненной атмосфере с 5 % CO_2 в среде DMEM (Gibco, Life Technologies, Россия) с низким содержанием глюкозы с глутамином с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, пенициллина (100 ед/мл) и стрептомицина

(100 мкг/мл) в общем объеме 15 мл в пластиковых флаконах для культур клеток (75 см²) (Corning Costar, США). При достижении 70 % монослоя (после 48 ч роста) клетки трехкратно осторожно отмывали 15 мл среды DMEM с глутамином и культивировали в бесывороточной среде с добавлением 5 нг/мл TGF- β в течение 24 ч при температуре +37 °С. Все клеточные линии выращивали в 3 экземплярах, независимо обрабатывали и анализировали.

Получение лизатов линий опухолевых клеток U87.

Клетки монослойной культуры снимали с культуральных флаконов, осаждали центрифугированием со скоростью 1500 об/мин в течение 10 мин, супернатант удаляли, клетки ресуспендировали в 3 мл фосфатного буферного раствора (pH 7,4) и вновь осаждали центрифугированием. Отмывку клеток осуществляли 3 раза. Перед последним центрифугированием проводили подсчет клеток по стандартному методу в камере Горяева с трипановым синим. Клетки в количестве $(1-3) \times 10^6$ ресуспендировали в 1 мл лизирующего буфера. Готовили 1 мл лизирующего буфера (Sigma Aldrich, США). Для этого смешивали 200 мкл буфера (250 mM Tris-HCl, pH 7,5; 5 mM EDTA; 200 мкл 750 mM хлорида натрия (NaCl); 200 мкл 0,5 % додецилсульфата натрия (Lauryl sulfate); 200 мкл 2,5 % дезоксихолевой кислоты; 200 мкл 5 % игепала; 10 мкл коктейля ингибиторов протеаз. Все процедуры выполняли при температуре +4 °С. К клеткам добавляли 1 мл лизирующего буфера. Инкубировали на протяжении 15 мин в охлаждаемом шейкере Eppendorf Thermomixer Comfort (Германия). Центрифугировали в течение 1 ч в охлаждаемой центрифуге Eppendorf Centrifuge 5415 F (Германия). Супернатант отбирали для дальнейшего исследования. Полученные в результате лизиса образцы очищали от низкомолекулярных соединений с помощью Agilent Spin Concentrators for Proteins 5 кДа (США).

Очистка клеточных лизатов от низкомолекулярных соединений. Образец (300–500 мкл в зависимости от количества лизированных клеток) вносили в концентратор 5 кДа, добавляли 4,0 мл 8 М мочевины в 0,1 М Tris-HCl и центрифугировали со скоростью 3000 об/мин до того момента, когда над фильтром оставалось 300 мкл жидкости. Подобную промывку повторяли 4 раза с 4,0 мл воды (MilliQ). Полученные 300 мкл образца ресуспендировали и отбирали. Дополнительно образец смывали с концентратора дважды по 200 мкл воды (MilliQ). В итоге полученные 700 мкл образца использовали для дальнейшего исследования: измеряли общий белок по поглощению на длине волны 280 нм на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 (Thermo, США). Принимали, что 1 единица оптической плотности соответствует 1 мг общего белка в 1 мл раствора. Рассчитывали количество лизата, в котором содержится 300–400 мкг белка и упаривали при температуре +30 °С в центрифужном испарителе Labconco CentriVar (США) до объема 10–20 мкл (если масса белка была < 300 мкг, то упаривали весь лизат).

Энзиматический гидролиз (трипсинолиз) образцов.

К высушенным лизатам добавляли по 25 мкл TFE, по 25 мкл 100 mM водного раствора NH₄HCO₃ и по 2 мкл свежеприготовленного 50 mM водного раствора TCEP. Реакционную смесь выдерживали 1 ч при температуре +60 °С, затем охлаждали до +25 °С, добавляли по 1 мкл свежеприготовленного 84 mM водного раствора иодацетамида и выдерживали 30 мин при температуре +25 °С, после чего добавляли по 100 мкл 100 mM раствора NH₄HCO₃, по 300 мкл воды и раствор трипсина в 1 mM соляной кислоте (концентрация трипсина 1 мкг/мкл, соотношение трипсин:белок 1:50 по массе) и выдерживали 18 ч при температуре +37 °С. По 4 мкл растворов анализировали масс-спектрометрически для контроля проведения трипсинолиза. По окончании реакции содержимое пробирок упаривали досуха при температуре +30 °С на центрифужном испарителе Labconco CentriVar, а затем подвергали лиофильной сушке в течение ночи для полного удаления бикарбоната аммония.

Разделение триптических пептидов. Триптические пептиды растворяли в мобильной фазе А (30 % ACN, 70 % воды, 0,1 % FA, pH 2,7) так, чтобы в 20 мкл раствора было 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, США): объем инжестируемой пробы 20 мкл, поток растворителя 30 мкл/мин, температура колонки +25 °С, детекция по ультрафиолетовому поглощению при длинах волн 214 и 281 нм. Растворители: мобильная фаза А — 30 % ACN, 70 % воды, 0,1 % FA; мобильная фаза В — мобильная фаза А + 500 mM KCl. Градиент: 0–5 мин 0 % фазы В, 5–85 мин 0–20 % фазы В, 85–89 мин — 20–100 % фазы В, 89–94 мин 100 % фазы В, 94–95 мин 100–0 % фазы В, затем уравнивание колонки в течение 30 мин на фазе А. Собирали 24 фракции со 2-й по 50-ю минуту через равные промежутки времени в 2 мин. Полученные фракции упаривали досуха при температуре +30 °С на центрифужном испарителе, а затем перерастворяли в 100 мкл 0,1 % водного раствора FA.

Масс-спектрометрический анализ. Анализ триптических пептидов проводили на нанопоточном хроматографе Dionex Ultimate 3000 (Нидерланды) в сочетании с масс-спектрометром LTQ Orbitrap XL (Thermo) с источником ионизации NSI. Разделение пептидов осуществляли на колонке Acclaim C18 PepMap100 (75 мкм × 150 мм, размер зерна 3 мкм, Dionex), снабженной предколонкой. Образец (20 мкл) загружали на предколонку в течение 1 мин в 99,9 % воды/0,1 % FA, затем отмывали от соли 4 мин 0,1 % раствором TFA в воде и еще 1 мин уравнивали 99,9 % воды/0,1 % FA; скорость потока 30 мкл/мин. Условия хроматографирования: скорость потока 0,3 мкл/мин, мобильная фаза А — 95 % воды/5 % диметилсульфоксида (DMSO)/0,1 % FA, мобильная фаза В — 10 % воды/5 %

DMSO/85 % ACN/0,1 % FA. Градиент: 0–6 мин 20 % фазы В, 6–126 мин 20–45 % фазы В, 126–150 мин 45–100 % фазы В, 150–160 мин 100 % фазы В, 160–165 мин 100–0 % фазы В, продолжительность анализа 175 мин. Масс-спектры (МС) регистрировали в режиме положительных ионов в диапазоне m/z 300–2000 Да, напряжение на игле 2,0 кВ, температура источника +275 °С, напряжение на капилляре 29,48 В, на линзе 120 В. МС регистрировали в орбитальной ловушке в режиме FT (разрешение 30 000, число накапливаемых ионов 1×10^6 , максимальное время накопления 700 мс, 1 микро-скан), спектры МС/МС получали при ионизации, обусловленной соударениями (CID) в линейной ловушке (режим сканирования Enhanced, число накапливаемых ионов 1×10^4 , максимальное время накопления 150 мс, 1 микро-скан, энергия соударений 35 % от максимальной). Спектры МС/МС регистрировали для 12 самых интенсивных ионов. Динамическое исключение включалось после регистрации 1 спектра, время исключения 1 мин. Вторичной фрагментации подвергали ионы с зарядом больше +1.

Анализ данных. Для идентификации белков МС использовали программу MaxQuant v1.5.2.8. Для обработки данных и идентификации белков применяли параметры по умолчанию. Исключения: база данных SwissProt_human (версия 2015_04), энзим – трипсин, число пропущенных разрывов 2, фиксированные модификации – карбамидометилирование, возможные модификации – ацетилирование N-конца белка, окисленный метионин, пироглутамин и пироглутаминовая кислота, точность масс родительского иона для первичного поиска 25 ppm, для основного поиска после перекалибровки – 6 ppm, фрагментов 0,8 Да, минимальная длина пептидов 5 аминокислот, максимальная – 100, максимальная масса пептидов 7000 Да, опция зависимые пептиды включена. Для количественного расчета использовали метод label-free (без метки) для всех идентифицированных пептидов. Таблицу идентифицированных семейств белков обрабатывали в программе Perseus v1.5.1.6 для аннотирования и удаления белков-контаминантов и ложноположительных идентификаций, а также для определения статистической значимости отличий в уровнях белков, полученных методом label-free. Значимыми считали отличия на уровне достоверности $p < 0,05$ для парного t-критерия Стьюдента.

Результаты

Мы использовали label-free количественный протеомный nano-LC–MS/MS метод для детектирования и сравнения ДЭБ в лизатах линии клеток глиобластомы человека U87 до и после обработки их TGF- β 1. Анализ триптических пептидов по их 328 312 спектрам МС/МС с помощью программного пакета MaxQuant просеквенировал 2589 протеинов по 19 748 (15 309 уникальных) пептидам при сравнении с данными базы SwissProt_human и ложным уровнем обнаружения

(a false discovery rate) 1 % для тройных повторов 2 видов образцов. Из них 2482 белка идентифицировали по 19 555 (15 119 уникальных) пептидам в контрольных клетках U87 и 2566 белков – по 19 695 (15 257 уникальных) пептидам в клетках U87 после стимуляции TGF- β 1. Для всех линий клеток ~91 % белков идентифицировали по более чем 2 пептидам. Диапазон молекулярного веса протеинов изменялся от 1,91 до 3713,70 кДа, из них 896 имели молекулярный вес до 30 кДа; 1280 – 30–100 кДа; 371 – 100–300 кДа; 26 – 300–500 кДа; 16 – более 500 кДа. Процент покрытия анализируемых белков варьировался от 0,3 до 100 %, из них 1446 белков с покрытием до 20 %, 658 – 20–40 %, 315 – 40–60 %, 170–60–100 %. Коэффициент корреляции Пирсона для данных образцов клеток U87 до и после стимуляции TGF- β 1 был 0,904–0,952.

Идентифицированные протеины показали высокий процент перекрытия для 2 клеточных популяций. Во всех клеточных лизатах детектировались 2459 (95 % от 2589) белков, только в клетках U87 – 23 и 107 протеинов были уникальными для клеток U87 после их стимуляции TGF- β 1.

Статистически значимые ($p < 0,05$) изменения в экспрессии после обработки клеток TGF- β 1 зарегистрированы для 656 белков. Изменял экспрессию более чем в 2 раза 281 протеин, увеличивали 160 протеинов, а уменьшал 121 протеин. Повышение экспрессии более чем на порядок наблюдали у рецепторо-ассоциированного протеина ангиотензина II типа, инверсина, протеина CYR61, гуанозинтрифосфатсвязывающего протеина RAD, энлазы, миозина-14, ассоциированного с функцией лимфоцитов антигена-3, фактора роста соединительной ткани, индуцированного сигналом и связанного с пролиферацией подобного 1 белка 3. Одновременно снижение экспрессии более чем на порядок отмечали для кератиноассоциированного протеина 3–3, кератина типа II кутикулярного Hb2, предполагаемого кератина-87, гомолога-2 семейства фермитинов, N-ацетилтрансферазы-10, кератина типа I кутикулярного Ha4.

Динамический диапазон для идентифицированных белков составляет 6 порядков (от $4,1 \times 10^8$ до 363), что позволяет выявить низкокопийные белки, такие как коффилин-2, фактор, ингибирующий миграцию макрофагов, и др. Также были идентифицированы специфические маркеры мезенхимальных (CD44, интегрин $\alpha 5$ и $\beta 1$) и прогениторных (член A3 семейства альдегиддегидрогеназы-1) стволовых клеток глиобластомы и маркеры пронеурональной дифференцировки (тубулин $\beta 3$, нестин) нейральных прогениторных стволовых клеток. Во всех 2 образцах идентифицировали 2296 белков.

Полученные данные протеомного картирования белков различных типов клеток были подвергнуты сравнительному биоинформационному анализу. В дальнейшем были включены в анализ каждой из групп сравнения только те белки, у которых нормализованная

сигнальная интенсивность изменилась статистически значимо ($p < 0,05$).

Каждый идентифицированный белок, удовлетворяющий вышеназванным требованиям, классифицировали в соответствии с его клеточной локализацией на основании информации, доступной в базах данных Swiss-Prot, Gene Ontology и других открытых базах. Также учитывали тот факт, что если 1 белок находился более чем в 1 клеточном компартменте. По данным открытых баз, 656 белкам, изменившим экспрессию при стимуляции, соответствовали 506 генов. Клеточное распределение белков с известной локализацией, кодируемых этими генами, включало: клеточную часть (GO:0044464) – 43,8 %; органеллы (GO:0043226) – 28,0 %, макромолекулярный комплекс (GO:0032991) – 15,2 %, мембраны (GO:0016020) – 7,1 % и внеклеточный регион (GO:0005576) – 3,4 %.

Протеины картировали по биологической роли в клетке, молекулярной функции и функциональному классу в соответствии с протеомно-геномной аналитической программой PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships).

Основная часть ДЭБ участвовала в метаболических (GO:0008152; 28,8 %) и клеточных (GO:0009987; 21,9 %) процессах, а также в процессах биологической регуляции (GO:0065007; 8,8 %) и локализации (GO:0051179; 8,7 %). Большая часть ДЭБ проявляла каталитическую (GO:0003824; 34,8 %), связывающую (GO:0005488; 30,6 %), структурно-молекулярную (GO:0005198; 16,3 %), энзим-регуляторную (GO:0030234; 6,0 %), транскрипционную для связывания нуклеиновых кислот (GO:0001071; 2,8 %) и рецепторную активность (GO:0004872; 2,6 %). Основная часть ДЭБ представлена следующими классами: связывающие нуклеиновые кислоты (PC00171; 14,6 %), белки цитоскелета (PC00085; 11,2 %), гидролазы (PC00121; 9,0 %), трансферазы (PC00220; 7,7 %) и модуляторы энзимов (PC00095; 7,3 %).

Из 2589 идентифицированных белков мы рассчитали количество протеинов ($n = 656$), экспрессия которых статистически значимо изменялась при стимуляции клеток U87 фактором TGF- β 1. Основной биоинформационный анализ проводили с этой группой белков.

Для лучшего понимания биологических процессов и путей, включенных в TGF- β -индуцированные отклики, мы провели развернутый биоинформационный анализ с использованием KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) и биологических процессов GO (Gene Ontology). Отмечали значительное обогащение генов для процессов, которые могут быть включены в ЭМП [11]. К ним относятся: ПМК, фокальная адгезия, актиновый цитоскелет и др. Поэтому при анализе полученных данных этим процессам уделяли повышенное внимание. Полученные данные представлены в табл. 1 и 2. Статистически значимо увеличивали экспрессию при действии TGF- β 1 на клетки U87 пять белков (миозин, тяжелая цепь 14 (NM11C); немускульный миозин, тяжелая цепь 9 (NM11A); регуляторная

субъединица Б альфа изоформы протеинфосфатазы-2; катенин, альфа-1, 102 кДа; актинин, альфа-1), участвующие в образовании ПМК (см. табл. 1). Повышенную экспрессию у белков, связанных с фокальной адгезией, наблюдали у 12 протеинов (см. табл. 2), из них: у тромбоспондина-1; фибронектина-1; коллагена, тип I, альфа-2; протеинтирозинкиназы-2; тенасцина C; подобной Rho-ассоциированной, биспиральной протеинкиназы-1 и рецептора фактора роста, связанного с протеином-2, экспрессия увеличивалась более чем в 2 раза.

Обсуждение

В настоящее время нет доказательств возможной антионкогенной активности сигнального пути TGF- β в глиомах, такой как индукция старения, которая наблюдается при эпителиальном раке [7]. Обнаружена повышенная экспрессия TGF- β в злокачественных опухолях головного мозга, увеличивающая рост опухолевых клеток, их миграцию, инвазию, ангиогенез, супрессию иммунной системы [12]. TGF- β в глиомах секретируется как по аутокринному механизму клетками глиомы, так и образуется микроглиальными клетками. Аутокринную секрецию TGF- β наблюдали в клеточных линиях или в клетках, полученных из хирургически удаленных злокачественных глиом [13].

Суперсемейство TGF- β играет решающую роль в морфогенезе и спецификации потомков клеток в процессе развития мозга [14]. Н. Ikushima и соавт. показали, что аутокринный TGF- β -сигналинг очень важен для поддержания стволовости у стволовых клеток глиомы [15]. Инкубация клеток глиобластомы с TGF- β

Таблица 1. Изменение экспрессии белков, участвующих в образовании плотных межклеточных контактов, после стимуляции TGF- β 1 клеток U87

| Индекс гена | Название белка | TGF- β /Control |
|-------------|--|-----------------------|
| ACTB | Актин, бета | 0,75 |
| ACTG1 | Актин, гамма-1 | 0,74 |
| ACTN1 | Актин, альфа-1 | 1,34 |
| CTNNA1 | Катенин, альфа-1, 102 кДа | 2,09 |
| CSNK2B | Казеинкиназа-2, бета полипептид | 0,76 |
| MYH14 | Миозин, тяжелая цепь 14 (NM11C) | 16,91 |
| MYH9 | Миозин, тяжелая цепь 9, немускульный (NM11A) | 3,78 |
| PRKCA | Протеинкиназа C, альфа | 0,38 |
| PPP2R2A | Протеинфосфатаза-2, регуляторная субъединица Б, альфа изоформа | 2,90 |
| RAB13 | RAB13, член семейства онкогенов RAS | 0,72 |
| RRAS2 | Связанный вирусный (r-ras) гомолог онкогена 2 | 0,53 |
| TJP2 | Белок плотных контактов 2 | 0,71 |

Таблица 2. Изменение экспрессии белков фокальной адгезии после стимуляции TGF- β 1 клеток U87

| Индекс гена | Название белка | TGF- β /Control |
|-------------|---|-----------------------|
| CAPN2 | Кальпаин-2, (м/II) большая субъединица | 0,71 |
| CAV1 | Кавеолин-1 | 0,63 |
| COL1A2 | Коллаген, тип I, альфа-2 | 3,11 |
| COL6A1 | Коллаген, тип VI, альфа-1 | 1,58 |
| FN1 | Фибронектин-1 | 3,53 |
| FLNB | Филамин Б, бета | 1,27 |
| FYN | FYN-протоонкоген | 1,45 |
| GRB2 | Рецептор фактора роста, связанный с протеином-2 | 2,07 |
| ITGAV | Интегрин, альфа-5 | 1,58 |
| MAP2K1 | Митогенактивируемая протеинкиназа киназы-1 | 0,67 |
| PRKCA | Протеинкиназа C, альфа | 0,38 |
| PTK2 | Протеинтирозинкиназа-2 | 2,92 |
| ROCK1 | Rho-связанная протеинкиназа-1 | 2,13 |
| ROCK2 | Rho-связанная протеинкиназа-2 | 1,51 |
| THBS1 | Тромбоспондин-1 | 7,93 |
| TLN1 | Талин-1 | 0,89 |
| TLN2 | Талин-2 | 0,80 |
| TNC | Тенасцин C | 2,40 |

увеличивала число нейросфер в первичной культуре клеток опухоли головного мозга дозозависимым образом, показывая, что TGF- β повышает способность к самовозобновлению стволовых клеток глиомы [16].

В табл. 1 представлены белки, отвечающие за ПМК, которые меняют экспрессию в клетках U87 при действии TGF- β 1. Карта сигнальных путей, связанных с ПМК, изображена на рис. 1 (KEGG PATHWAY Database). Специализированные комплексы белков поверхности клеток формируют эпителиальные межклеточные соединения, которые важны для целостности эпителия. Клетки связываются друг с другом через субапикальные плотные контакты, адгезивные контакты, десмосомы и разрозненные контакты на латеральных поверхностях. После инициирования ЭМП эти контакты нарушаются и соединительные белки релокализуются и/или деградируют. Разрушение ПМК в процессе ЭМП сопровождается снижением экспрессии клаудина и окcludина и диффузией белка плотных контактов 1 (TJP1) из ПМК [17]. Во время дестабилизации адгезивных контактов эпителиальный кадгерин (Е-кадгерин) расщепляется в плазматической мембране и впоследствии деградирует [18]. После действия TGF- β 1 мы не отме-

чали статистически значимого изменения в экспрессии TJP1, в то время как уровни TJP2 снизились в 1,74 раза (см. табл. 1). TJP2 показывал положительную корреляцию с выживаемостью больных GBM [19]. Это говорит о том, что возможен баланс между матриксными металлопротеиназами и протеинами ПМК, который необходим для поддержания гематоэнцефалического барьера в GBM. Сдвиг в этом балансе может вызывать появление более агрессивного фенотипа, связанного с отеком мозга и инвазивностью опухолевых клеток [19].

PPP2R2A, известная как B55 α , является регуляторной субъединицей протеин серин/треонин фосфатазы A2 (PP2A). В раковых клетках снижение активности PP2A индуцирует активацию различных киназ, связанных с пролиферацией клеток, и промотирует опухолевую прогрессию [20]. PP2A регулирует многие внутриклеточные процессы, включая клеточный сигналинг, клеточный цикл, метаболизм, апоптоз и синтез протеинов [21]. Роль этой системы в молекулярных механизмах регуляции клеточных процессов TGF- β 1 практически не изучена. Имеются единичные данные об участии PP2R2A в TGF- β -индуцированном аресте пролиферации клеток [22]. TGF- β 1 увеличивал экспрессию PP2R2A в клетках U87 почти в 3 раза (см. табл. 1), что подтверждает ранее полученные данные [22].

Биоинформационный анализ показал высокое обогащение белками, участвующими в фокальной адгезии. Карта сигнальных путей фокальной адгезии изображена на рис. 2 (KEGG PATHWAY Database). В табл. 2 представлены ДЭБ, модулирующие этот процесс. Заметное повышение экспрессии под действием TGF- β 1 наблюдали для тромбоспондина-1 (в 7,93 раза), фибронектина-1 (в 3,53 раза), коллагена, тип I, альфа 2 (в 3,11 раза). Известно, что ЭМП активизирует экспрессию адгезивных молекул нейтральных клеток (neural cell adhesion molecule, NCAM), которые взаимодействуют с нейрональным кадгерином (N-кадгерином), для модуляции активности рецепторов тирозинкиназ [18]. NCAM взаимодействуют с FYN-киназой (нерецепторной тирозинкиназой src-семейства), ослабляя блок фокальной адгезии, миграции и инвазии [23]. Мы установили изменение экспрессии FYN-киназы в 1,45 раза и протеинтирозинкиназы-2 (PTK2) в 2,92 раза (см. табл. 2). Ремоделирование внеклеточного матрикса (extracellular matrix, ECM) и изменение взаимодействия клеток с ECM важны при иницировании и прогрессии ЭМП. Интегриновые комплексы позволяют клеткам получать сигналы от белков ECM через взаимодействие с сигнальными медиаторами, такими как интегринсвязанная киназа (ILK) и парвин [18]. После обработки TGF- β 1 клеток U87 в течение 24 ч наблюдали незначительное увеличение (в 1,18 раза) экспрессии ILK и отсутствие изменений у парвин- α , в то время как уровни парвин- β снижались в 1,51 раза. Изменения интегринового репертуара в процессе ЭМП коррелируют с увеличенной экспрессией протеаз, та-

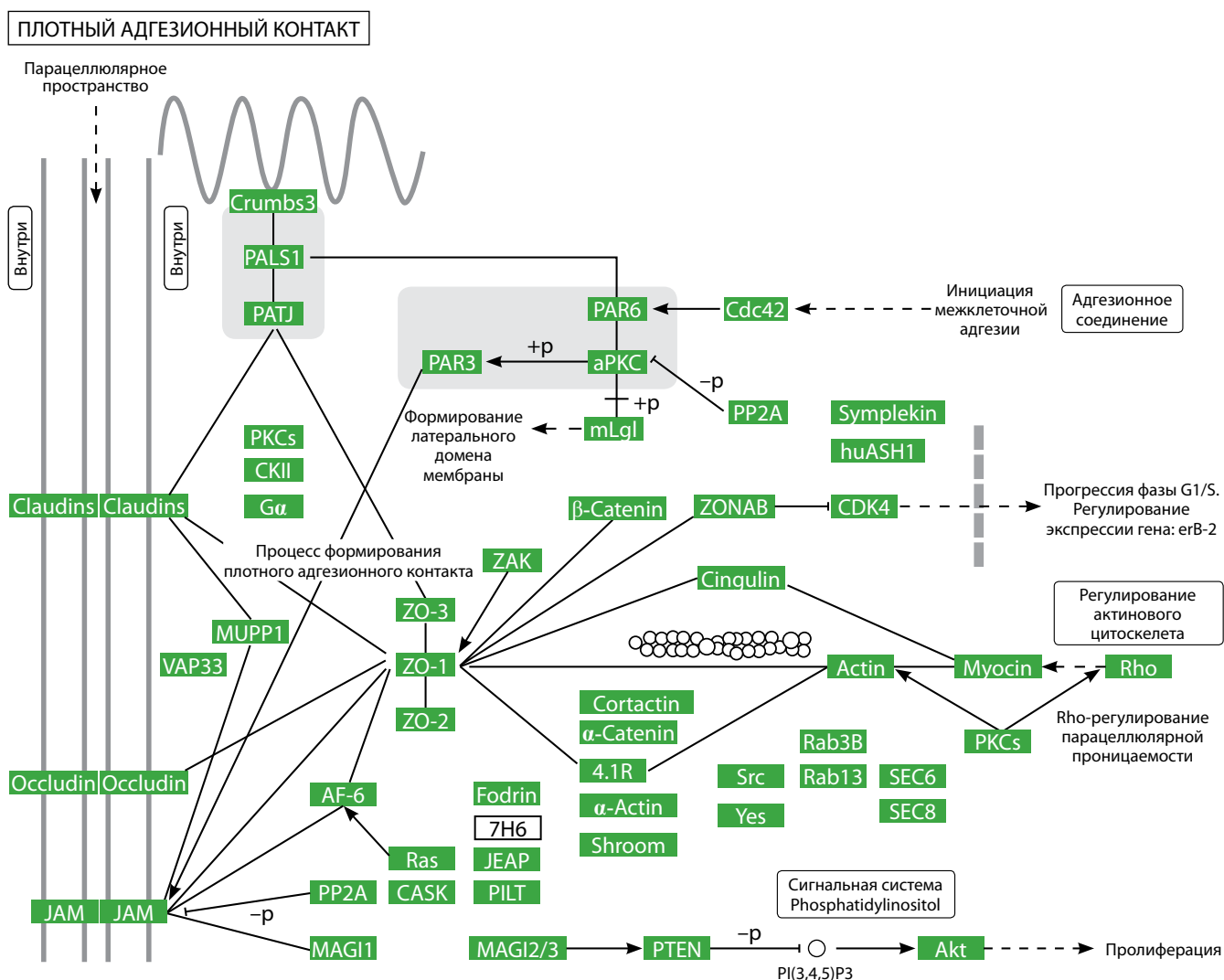


Рис. 1. Сигнальные пути, связанные с образованием плотных межклеточных контактов (KEGG PATHWAY Database)

ких как матричные металлопротеиназы MMP2 и MMP9, таким образом усиливая деградацию белков ECM и способствуя инвазии [24]. В этой связи мы отметили значительное увеличение (в 3,96 раза) экспрессии MMP2.

Rho-связанные протеинкиназы 1 (ROCK1) и 2 (ROCK2), серин/треонин протеинкиназы влияют на инвазию и миграцию клеток, изменяя статус цитоскелета. В последние годы было установлено, что ROCK1 сверхэкспрессируется в различных опухолях. Отмечено, что фактор роста эндотелия сосудов C (vascular endothelial growth factor, VEGF-C) вызывал метастазирование рака шейки матки через активацию и регуляцию сигнального пути RhoA/ROCK2/миезин [25]. При активации клеток глиобластомы TGF-β1 мы наблюдали статистически достоверное увеличение экспрессии миезина в 1,25 раза и ROCK2 в 1,51 раза. Повышенная экспрессия ROCK1 в ткани глиомы положительно коррелировала с ее злокачественностью. Результаты предварительных исследований показали, что пролиферацию и метастазирование клеток GBM можно

ингибировать, подавляя экспрессию ROCK1, который рассматривают в качестве новой мишени для терапии GBM [26]. Как видно из табл. 2, при действии TGF-β1 наблюдается увеличение экспрессии ROCK1 в 2,13 раза.

Повышенное содержание ECM в микроокружении глиомы играет решающую роль в поддержании морфологии ее клеток, пролиферации и дифференцировки. Фибронектины (fibronectins, FNs) являются основными компонентами ECM во многих солидных опухолях, включая GBM. В ряде работ отмечено высокое содержание FNs в ECM сфероидов глиом в опытах *in vitro* и *in vivo* [27]. Как видно из табл. 2, экспрессия FN1 значительно возрастает (в 3,53 раза) в клетках U87 при действии TGF-β1.

Важность эпигенетических альтераций при злокачественных новообразованиях хорошо известна. HDAC вовлекаются в структуру хроматина и регулируют транскрипцию генов, изменяя экспрессию при злокачественных глиомах. Ингибиторы HDAC использовали в попытке остановить рост и вызвать апоптоз раковых

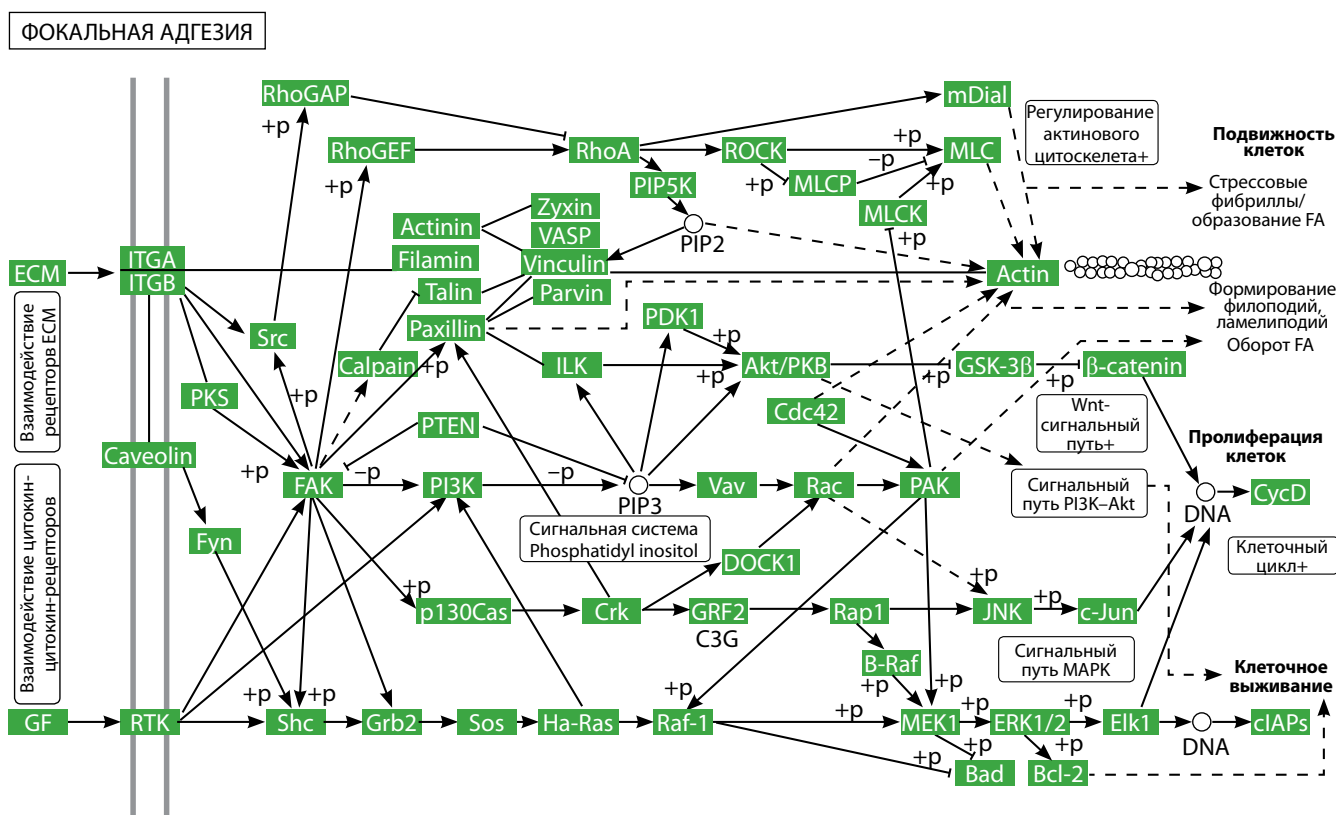


Рис. 2. Сигнальные пути, связанные с фокальной адгезией (KEGG PATHWAY Database)

клеток. Ацилазы гистонов (histone acetyltransferases, HAT) и гиперацетилирование гистонов также вызывают деградацию HIF-1 α и снижение уровня VEGF и, таким образом, приводят к антиангиогенным эффектам [28]. Лечение ингибиторами HDACs уменьшало пролиферацию полученных из глиобластомы стволовых клеток и вызывало их дифференцировку [29]. Анализ полученных данных выявил увеличение экспрессии HDAC1 в 1,48 раза, HDAC2 – в 1,31 раза и значительное (в 3,10 раза) повышение экспрессии HAT1.

HSP (особенно HSP90) – молекулярные шапероны, которые помогают в стабилизации белков-клиентов, таких как протеинкиназы и ряд транскрипционных факторов. HSP90 является необходимым элементом злокачественной трансформации, увеличения роста, выживания и инвазивности раковых клеток. HSP стабилизируют экспрессию рецептора эпидермального фактора роста vIII (EGFRvIII) и vIV (EGFRvIV) и, вероятно, поддерживают инвазивность GBM [30], их экспрессия незначительно росла при действии TGF- β 1 на клетки U87. Самое заметное (в 1,86 раза) изменение наблюдали у HSP90AA4P.

Белки семейства 14-3-3 (фосфосерин-/фосфотreonинсвязывающие белки) имеют 7 изоформ (b, r, 3, d, q, h и z), которые принимают схожую подковообразную структуру, способную закреплять pS/T-остатки [31]. Роль белков 14-3-3 в злокачественных опухолях и их взаимодействие с различным опухолеродными генами и генами-супрессорами опухоли сложна и ма-

ло изучена [32]. Предыдущие исследования продемонстрировали, что иммунореактивность изоформ 14-3-3b, 3, d, q, h и z наблюдалась в большинстве образцов с астроцитом, и их иммунореактивные показатели заметно увеличивались с ростом стадии заболевания [33]. Были идентифицированы 14-3-3b и 14-3-3h как 2 опухолевоспецифические изоформы 14-3-3 в астроцитоме, которые рассматриваются в настоящее время как потенциальные мишени для генотерапии [34]. Показано, что 14-3-3b регулирует пролиферацию клеток глиомы через GSK3b-связанный сигнальный путь [35]. Однако точная роль 14-3-3b в человеческих GBM еще не изучена. В нашем эксперименте экспрессия белков 14-3-3 статистически значимо не изменялась при действии TGF- β 1 на клетки U87.

Белки S100, такие как S100B, S100A2, S100A4, S100A6 и S100P, гиперэкспрессированы в первичных опухолях многих видов рака, в том числе молочной железы, головного мозга, легких, поджелудочной железы, предстательной железы и толстой кишки [36]. К тому же повышенная экспрессия этих белков в первичной опухоли часто ассоциируется с плохим прогнозом заболевания, как полагают, из-за их способности индуцировать миграцию и метастазирование опухолевых клеток [37]. Увеличение экспрессии некоторых белков S100 в клетках с помощью трансфекции может модулировать цитоскелет и усиливать миграцию клеток во многих модельных системах *in vitro* [37]. Основные молекулы актомиозинового цитоскелета

в опухолевых клетках являются изоформами немускульного миозина IIs (non-muscle myosin IIs, NMPIs), NMPIA, NMPIB и NMPIIC. NMPIA связан с организацией стресс-фибрилл, фокальных участков адгезии и тканевой архитектурой. NMPIB участвует в стабилизации нормальной полярности клеток и имеет важное значение для развития сердца и мозга. NMPIIC — недавно открытая изоформа, функция которой мало изучена, но она может действовать совместно с NMPIA и NMPIB [37].

В лизатах линии опухолевых клеток U87 до и после обработки их TGF- β 1 мы идентифицировали 9 членов этого семейства белков: S100P, S100A6, S100A7, S100A8, S100A9, S100A10, S100A11, S100A13, S100A16. Заметное увеличение экспрессии отмечали для S100A7 (в 1,93 раза) и S100P (в 1,54 раза). На фоне изменения их уровней зарегистрировали значительное повышение экспрессии NMPIA и NMPIIC в 3,78 и 16,91 раза соответственно.

Нокдаун NMPIA заметно усиливал эффект S100P, направленный на повышение миграции клеток, что свидетельствовало о том, что он является основным эффектором сигнального пути S100P, который различным образом взаимодействовал с NMPI-изоформами с наибольшим сродством к NMDA (\geq NMPIIC \geq NMPIB) [37].

Заключение

В данной работе впервые изучены молекулярные механизмы действия TGF- β 1 на клетки U87 глиобластомы человека. Выявлены внутриклеточные сигнальные пути, ответственные за участие TGF- β 1 в онкогенезе злокачественных глиом и включающие ДЭБ фокальной адгезии, ПМК, HDAC, HSP, семейства S100. Установлены важные закономерности, которые могут быть использованы при разработке новых подходов для обнаружения кандидатных маркеров метастазирования глиобластомы и потенциальных мишеней для терапии этого заболевания.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Holland E.C. Glioblastoma multiforme: the terminator. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(12):6242–4.
- Adamson C., Kanu O.O., Mehta A.I. et al. Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going. *Expert Opin Investig Drugs* 2009;18(8):1061–83.
- Wang Y., Jiang T. Understanding high grade glioma: molecular mechanism, therapy and comprehensive management. *Cancer Lett* 2013;331:139–46.
- Westphal M., Lamszus K. The neurobiology of gliomas: from cell biology to the development of therapeutic approaches. *Nat Rev Neurosci* 2011;12(9):495–508.
- Rich J.N. The role of transforming growth factor-beta in primary brain tumors. *Front Biosci* 2003;8:e245–60.
- 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.
- Seoane J. Escaping from the TGF-beta anti-proliferative control. *Carcinogenesis* 2006;27(11):2148–56.
- Siegel P.M., Massague J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3(11):807–21.
- Rahimi R.A., Leof E.B. TGF-beta signaling: a tale of two responses. *J Cell Biochem* 2007;102(3):593–608.
- Taube J.H., Herschkowitz J.I., Komurov K. et al. Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107(35):15449–54.
- Lamouille S., Xu J., Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial – mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15(3):178–96.
- Platten M., Wick W., Weller M. Malignant glioma biology: role for TGF-beta in growth, motility, angiogenesis, and immune escape. *Microsc Res Tech* 2001;52(4):401–10.
- Wesolowska A., Kwiatkowska A., Slomnicki L. et al. Microglia-derived TGF-beta as an important regulator of glioblastoma invasion – an inhibition of TGF-beta-dependent effects by shRNA against human TGF-beta type II receptor. *Oncogene* 2008;27(7):918–30.
- Muñoz-Sanjuán I., Brivanlou A.H. Neural induction, the default model and embryonic stem cells. *Nat Rev Neurosci* 2002;3(4):271–80.
- 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.
- Peñuelas S., Anido J., Prieto-Sánchez R.M. et al. TGF-beta increases glioma-initiating cell self-renewal through the induction of LIF in human glioblastoma. *Cancer Cell* 2009;15(4):315–27.
- Huang R.Y., Guilford P., Thiery J.P. Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Sci* 2012;125(Pt 19):4417–22.
- Yilmaz M., Christofori G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev* 2009;28(1–2):15–33.
- Pope W.B., Chen J.H., Dong J. et al. Relationship between gene expression and enhancement in glioblastoma multiforme: exploratory DNA microarray analysis. *Radiology* 2008;249(1):268–77.
- Zimmerman R., Peng D.J., Lanz H. et al. PP2A inactivation is a crucial step in triggering apoptin-induced tumor-selective cell killing. *Cell Death Dis* 2012;3:e291.
- Schonthal A.H. Role of serine/threonine protein phosphatase 2A in cancer. *Cancer Lett* 2001;170(1):1–13.
- Zhang D., Wang J., Wang Z. et al. miR-136 modulates TGF- β 1-induced proliferation arrest by targeting PPP2R2A in keratinocytes. *Biomed Res Int* 2015;2015:453518.
- Lehembre F., Yilmaz M., Wicki A. et al. NCAM-induced focal adhesion assembly: a functional switch upon loss of E-cadherin. *EMBO J* 2008;27(19):2603–15.
- Nistico P., Bissell M.J., Radisky D.C. Epithelial-mesenchymal transition: general principles and pathological relevance with special emphasis on the role of matrix metalloproteinases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012;4(2):a011908.
- He M., Cheng Y., Li W. et al. Vascular endothelial growth factor C promotes cervical cancer metastasis via up-regulation and activation of RhoA/ROCK-2/moesin cascade. *BMC Cancer* 2010;10:170.
- Zhang P., Lu Y., Liu X.Y., Zhou Y.H. Knockdown of Rho-associated protein kinase 1 suppresses proliferation and invasion of glioma cells. *Tumour Biol* 2015;36(1):421–8.
- Zhang B., Shen S., Liao Z. et al. Targeting fibronectins of glioma extracellular matrix by CLT1 peptide-conjugated nanoparticles. *Biomaterials* 2014;35(13):4088–98.

28. Galanis E., Jaeckle K.A., Maurer M.J. et al. Phase II trial of vorinostat in recurrent glioblastoma multiforme: a north central cancer treatment group study. *J Clin Oncol* 2009;27(12):2052–8.
29. Alvarez A.A., Field M., Bushnev S. et al. The effect of histone deacetylase inhibitors on glioblastoma derived cells. *J Mol Neurosci* 2015;55(1):7–20.
30. Pines G., Huang P.H., Zwing Y. et al. EGFRvIV: a previously uncharacterized oncogenic mutant reveals a kinase autoinhibitory mechanism. *Oncogene* 2010;29(43):5850–60.
31. Aitken A. 14-3-3 proteins: a historic overview. *Semin Cancer Biol* 2006;16(3):162–72.
32. Liang S., Shen G., Liu Q. et al. Isoform-specific expression and characterization of 14-3-3 proteins in human glioma tissues discovered by stable isotope labeling with amino acids in cell culture-based proteomic analysis. *Proteomics Clin Appl* 2009;3(6):743–53.
33. Cao L., Cao W., Zhang W. et al. Identification of 14-3-3 protein isoforms in human astrocytoma by immunohistochemistry. *Neurosci Lett* 2008;432(2):94–9.
34. Yang X., Cao W., Lin H. et al. Isoform-specific expression of 14-3-3 proteins in human astrocytoma. *J Neurol Sci* 2009;276(1–2):54–9.
35. Gong F., Wang G., Ye J. et al. 14-3-3 beta regulates the proliferation of glioma cells through the GSK3 beta/beta-catenin signaling pathway. *Oncol Rep* 2013;30(6):2976–82.
36. Salama I., Malone P.S., Mihaimeed F., Jones J.L. A review of the S100 proteins in cancer. *Eur J Surg Oncol* 2008;34(4):357–64.
37. Du M., Wang G., Ismail T.M. et al. S100P dissociates myosin IIA filaments and focal adhesion sites to reduce cell adhesion and enhance cell migration. *J Biol Chem* 2012;287(19):15330–44.