

УДК 576.385.5:616-006-092.4/.9

БЕЛКИ Arf6, RalA И BIRC5 ПРИ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ЛЕГКОГО

© 2011 г. А. В. Книжник¹, О. В. Ковалева¹, К. К. Лактионов², В. В. Мочальникова²,
А. В. Комельков¹, Е. М. Чевкина¹, И. Б. Зборовская^{1*}

¹Научно-исследовательский институт канцерогенеза Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина Российской академии медицинских наук, Москва, 115478

²Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина Российской академии медицинских наук, Москва, 115478

Поступила в редакцию 23.03.2010 г.

Принята к печати 26.05.2010 г.

Определение спектра маркеров, ассоциированных с индивидуальными параметрами опухолевой прогрессии, — одно из приоритетных направлений молекулярной онкологии. Изучены изменения продукции некоторых белков, вовлеченных в Ras-Ral-ассоциированную передачу внутриклеточных сигналов (Arf6, RalA и BIRC5), при немелкоклеточном раке легкого. Методом Вестерн-блоттинга проанализирована продукция перечисленных белков в 53 образцах немелкоклеточного рака легкого различного генеза. Показано, что в 55% образцов немелкоклеточного рака легкого уровень белка Arf6 выше, чем в условно нормальной ткани, причем при плоскоклеточном раке легкого такое увеличение встречается чаще. В 64% образцов немелкоклеточного рака легкого, независимо от их морфологической структуры, продукция белка RalA снижена по сравнению с условно нормальной тканью. Обнаружена связь между снижением уровня белка RalA и отсутствием регионарных метастазов при плоскоклеточном раке легкого. Продукция белка BIRC5 увеличивалась в 76% образцов плоскоклеточного рака легкого, что в 1.3 раза чаще, чем в аденокарциномах, в которых повышение уровня этого белка отмечено в 63% образцов. Обнаружено статистически значимое снижение уровня белка RalA ($p = 0.015$) и повышение уровня белка Arf6 ($p = 0.049$) в группах так называемых “малых раков” ($T_{1-2}N_0M_0$ и $T_{1-2}N_{1-2}M_0$) плоскоклеточного рака легкого по сравнению с образцами условно нормальной легочной ткани.

Ключевые слова: плоскоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, аденокарцинома, RalA, Arf6, BIRC5, сурвивин.

Arf6, RalA AND BIRC5 PROTEIN EXPRESSION IN NON SMALL CELL LUNG CANCER, by A. V. Knizhnik¹, O. V. Kovaleva¹, K. K. Laktionov², V. V. Mochalnikova², A. V. Komelkov¹, E. M. Tchekina¹, I. B. Zborovskaya^{1*} (¹Institute of Carcinogenesis, Blokhin Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Science, Moscow, 115478 Russia; *e-mail: camel@crc.umos.ru; ²Blokhin Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 115478 Russia). Evaluation of tumor markers expression pattern which determines individual progression parameters is one of the major topics in molecular oncopathology research. This work presents research on expression analysis of several Ras-Ral associated signal transduction pathway proteins (Arf6, RalA and BIRC5) in accordance with clinical criteria in non small cell lung cancer patients. Using Western-blot analysis and RT-PCR Arf6, RalA and BIRC5 expression has been analyzed in parallel in 53 non small cell lung cancer samples of different origin. Arf6 protein expression was elevated in 55% non small cell lung cancer tumor samples in comparison with normal tissue. In the group of squamous cell lung cancer Arf6 expression elevation was observed more often. RalA protein expression was decreased in comparison to normal tissue samples in 64% of non small cell lung cancer regardless to morphological structure. Correlation between RalA protein expression decrease and absence of regional metastases was revealed for squamous cell lung cancer. BIRC5 protein expression in tumor samples versus corresponding normal tissue was 1.3 times more often elevated in the squamous cell lung cancer group (in 76% tumor samples). At the same time elevation of BIRC5 expression was fixed only in 63% of adenocarcinoma tumor samples. A statistically significant decrease ($p = 0.0158$) of RalA protein expression and increase ($p = 0.0498$) of Arf6 protein expression in comparison with normal tissue was found for $T_{1-2}N_0M_0$ and $T_{1-2}N_{1-2}M_0$ groups of squamous cell lung cancer correspondingly.

Keywords: lung cancer, NSCLC, SCC, ADC, RalA, Arf6, BIRC5, survivin.

Принятые сокращения: РЛ — рак легкого; НМРЛ — немелкоклеточный рак легкого; ПКРЛ — плоскоклеточный рак легкого; АК — аденокарцинома; ОТ-ПЦР — метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией.

* Эл. почта: camel@crc.umos.ru.

RalA и Arf6 входят в разные подсемейства малых GTPаз Ras. Малые GTPазы — это белки, активные в составе комплекса с GTP и неактивные в комплексе с GDP. Для активации и инактивации малых GTPаз необходимы белки GEF (GTPase Exchange Factors) и GAP (GTPase activating proteins) соответственно.

Белки Ral выполняют множество функций в клетках млекопитающих: регулируют мембранный транспорт, апоптоз, транскрипцию, миграцию и пролиферацию клеток, а также влияют на процессы онкогенеза [1]. Белок Arf6 участвует в регуляции ключевых процессов, а именно в миграции, цитокинезе и эндоцитозе, а также в опухолевой трансформации клеток [2]. Одна из особенностей белков Arf состоит в присутствии на N-конце молекулы амфифильной спирали, ко второму остатку глицина которой присоединена миристильная группа [3]. Эта модификация важна для связывания Arf6 с мембранами, регуляции процессов эндоцитоза, взаимодействия с белками GEF и, возможно, с одним из основных эффекторов Arf6 — фосфолипазой D (PLD) [4–6]. PLD катализирует гидролиз фосфатидилхолина до фосфатидной кислоты и холина — важнейших вторых посредников. PLD участвует, в основном, в процессах секреции, реорганизации актина, а также в прикреплении и миграции клеток. Arf6 и RalA колокализуются в клетке в специфических мембранных доменах, так называемых липидных рафтах, где проявляет основную активность и PLD. Для активации PLD в ответ на различные факторы роста и сигнальные молекулы (фактор роста эпидермиса (EGF), фактор роста тромбоцитов (PDGF), Src, H-Ras, Raf и инсулин) необходима комбинация активированных RalA и Arf6 [7]. Следует отметить, что упомянутые сигнальные молекулы играют ключевые роли в процессах, ассоциированных со злокачественной трансформацией клеток.

Существует модель опосредованной Ras активации PLD, согласно которой митогенные сигналы от H-Ras стимулируют два параллельных пути, приводящих к активации белков RalA и Arf6 с помощью GEF. RalA рекрутирует Arf6 в комплекс RalA-PLD [8]. Кроме того, активность PLD повышена в клеточных линиях с мутациями в генах *H-Ras* и *K-Ras*, характерными для многих злокачественных новообразований человека, в том числе и рака легкого (РЛ) [9]. В первичных опухолях некоторых типов, например при раке молочной железы и почек человека, также повышена активность PLD [10, 11]. Одним из эффектов активации PLD может быть стимуляция антиапоптотической киназы mTOR (mammalian target of rapamycin). При гипоксии и недостатке питательных веществ наблюдается подавление активности киназы mTOR, что приводит к апоптозу. Показано, что в некоторых линиях клеток рака молочной железы mTOR активируется преимущественно с участием PLD [12]. Активация mTOR может приводить к повышению уровня белка BIRC5 (Baculoviral

IAP repeat, сурвивин) [13], который входит в семейство ингибиторов апоптоза (IAP). Характер экспрессии гена *BIRC5* достаточно специфичен. Сурвивин активно синтезируется во время эмбриогенеза, практически не обнаруживается в дифференцированных клетках взрослого организма, однако при злокачественной трансформации клеток его синтез восстанавливается [14]. В связи с этим предпринимались многочисленные попытки использовать сурвивин в качестве маркера развития и/или прогноза онкологических заболеваний. Особенно это актуально в отношении РЛ, как одной из самых неблагоприятно протекающих онкопатологий [15, 16]. В 2010 году опубликованы результаты исследований, свидетельствующие в пользу непосредственного участия сурвивина не только в программируемой клеточной гибели, но и в регуляции процессов метастазирования [17]. В экспериментальных системах *in vivo* показано, что в регуляции процессов метастазирования может принимать участие и RalA [18–20]. Следует отметить отсутствие данных о возможной взаимной регуляции малых GTPаз RalA и Arf6 и сурвивина. Несмотря на то, что на клеточных культурах можно изучать механизмы опухолевой прогрессии, огромный интерес представляют данные, полученные в результате изучения первичных опухолей человека, так как они могут определять тактику поиска маркеров и их использования для мониторинга и оценки эффективности лечения.

Цель нашей работы — сравнительный анализ возможных изменений уровня продукции белков Arf6, RalA и основной изоформы сурвивина в образцах первичных опухолей немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), а также поиск взаимозависимых изменений продукции этих белков как возможных участников единого потенциального сигнального пути, играющего немаловажную роль в прогрессии и течении НМРЛ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Образцы тканей двух основных гистологических типов НМРЛ — плоскоклеточного рака (ПКРЛ) и аденокарциномы (АК), и прилегающих к опухолям морфологически нормальных тканей, так называемых условных норм, получены от больных, оперированных в 2005–2008 гг. по поводу РЛ в НИИ КО РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Весь материал проходил двойную гистологическую верификацию согласно последней классификации ВОЗ (Histological Typing of Lung and Pleural Tumors третьего пересмотра, IARC Press, Lyon, 2004) в отделе патологической анатомии опухолей человека НИИ КО ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН и охарактеризован в соответствии с TNM-классификацией шестого пересмотра (версия 2003 г.). Образцы тканей замораживали и хранили в жидком азоте до использования для выделения нуклеиновых кислот и приготовления белковых лизатов. В анализ брали только те об-

разцы, в которых по данным гистологического исследования опухолевые клетки составляли не менее 75%. Как правило, в используемых образцах опухолевые клетки составляли 90–100%. В работе приведены результаты анализа 53 образцов НМРЛ, клинические характеристики которых представлены в табл. 1.

Выделение РНК из тканей легкого. Суммарную РНК из замороженных в жидком азоте измельченных образцов нормальных и опухолевых тканей легкого выделяли с использованием реактива TRIzol (“Life Technologies, Inc.”) согласно рекомендациям фирмы-производителя.

Образец ткани ресуспендировали в 1 мл реактива TRIzol. К суспензии добавляли 200 мкл хлороформа, затем центрифугировали (10 мин, 12000 об/мин при 4°C). Верхнюю фазу осаждали равным объемом изопропилового спирта с последующим центрифугированием (15 мин, 12000 об/мин при 4°C). Осадок РНК промывали 1 мл 70%-ного этилового спирта, подсушивали и растворяли в 100 мкл обработанной диэтилпиракарбонатом воды. Концентрацию и качество РНК определяли на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 (“NanoDrop Technologies Inc.”). Соотношение A_{260}/A_{280} в образцах РНК было не менее 1.8–2.0.

Получение кДНК. Для получения одноцепочечных кДНК брали 2 мкг суммарной РНК, предварительно обработанной ДНКазой I (“Fermentas”, Литва, 1 ед. на 1 мкг РНК). Реакцию обратной транскрипции проводили по стандартной методике в объеме 50 мкл; реакционная смесь содержала 2 мкг суммарной РНК, 80 пМ олиго-dT18-праймера (“Синтол”, Россия), по 400 мкМ каждого нуклеотида, буфер для обратной транскриптазы, 250 ед. ингибитора нуклеаз и 200 ед. обратной транскриптазы MMuLV (“Fermentas”). Реакцию проводили при 42°C в течение 60 мин.

ОТ-ПЦР. Матрицей для ПЦР служила кДНК из опухолевых и условно нормальных тканей. Реакционная смесь включала 5'- и 3'-праймеры (по 10 пМ), амплификационный буфер (“Силекс”), 1–2 ед. Таq-ДНК-полимеразы (“СибЭнзим”, Россия). Проводили от 25 до 32 циклов ПЦР. Использовали праймеры Arf6 f (5'-GGAACTTGAAACCCTCATG-3'), Arf6 r (5'-ACATCTCACCTGCAACATTC-3'), GAPDH f (5'-TGCACCACCAACTGCTTAG-3'), GAPDH r (5'-CTGTTGCTGTAGCCAAATTC-3'), Survivin f (5'-GCATGGGTGCCCGACGTTG-3'), Survivin r (5'-GCTCCGGCCAGAGGCCTCAA-3') и следующую программу ПЦР: 95°C – 1 мин; 95°C – 30 с; 56°C – 30 с; 72°C – 30 с; 72°C – 2 мин. Продукты ПЦР анализировали в 1.5%-ном агарозном-TBE-геле, гель фотографировали с помощью системы детекции и анализа изображений Kodak GelLogic 2200 Imaging system с последующей обработкой изображений в программе Kodak Molecular Imaging Software SE ver.5.0.1.27.

Таблица 1. Клинические характеристики образцов немелкоклеточного рака легкого

Показатель		АК	ПКРЛ	Всего
Стадия заболевания	I–II	13	15	28
	III–IV	11	14	25
Дифференцировка опухолевых клеток	в/д	1	1	2
	у/д	15	21	36
	н/д	8	7	15
Метастазы в регионарные лимфоузлы	N0	10	11	21
	N+	14	18	32
Всего		24	29	53

Примечание. в/д – высоко дифференцированная опухоль; у/д – умеренно дифференцированная опухоль; N0 – отсутствие метастатического поражения регионарных лимфоузлов; N+ – метастатическое поражение регионарных лимфоузлов.

Вестерн-блот-гибридизация. Для получения белкового лизата аликвоты тех же образцов условно нормальных и опухолевых тканей легкого, замороженные в жидком азоте, гомогенизировали в лизирующем буфере (100 мМ NaCl, 10 мМ Трис-НCl, pH 7.8, 10 мМ EDTA, 1% Тритона X-100, 10% глицерина, 0.1% додецилсульфата натрия (SDS), 0.5% дезоксихолата натрия, 0.05 мМ ортованадат натрия, 10 мМ фторид натрия, ингибиторы протеаз) и инкубировали в течение 16 ч при 4°C и постоянном перемешивании. После центрифугирования лизатов (20 мин, 12000 об/мин при 4°C) в надосадочной жидкости определяли концентрацию белков методом Брэдфорд (“Bio-Rad Laboratories GmbH”) согласно рекомендациям производителя.

Образцы, содержащие по 20 мкг суммарного белка, разделяли в вертикальном 12%-ном денатурирующем полиакриламидном геле в Трис-глициновом буфере при 100 В и 30 мА, а затем переносили на PVDF-мембрану (“Millipore”) в Трис-глициновом буфере, содержащем 20%-ный этанол, при 100 В и 250 мА в течение 1 ч. Качество переноса проверяли, окрашивая мембраны красителем Ponceau S (“Sigma”). Мембрану инкубировали в блокирующем растворе (5% обезжиренного молока, 0.1% Tween-20 (“Serva”) в буфере TBS) в течение 1 ч при комнатной температуре. Продукцию белков анализировали с помощью антител к Arf6 (“Sigma”, A5230), сурвивину (“Abcam”, ab24479), β -актину (“Abcam”, ab8227). В качестве вторых антител использовали козы анти-мышинные и козы анти-кроличьи антитела (“Upstate”, Cell Signaling), конъюгированные с пероксидазой хрена.

После стандартной отмывки белки проявляли с помощью реагента для хемилюминесцентной реакции ECL (“Millipore”) и фотографировали изображение с помощью системы детекции и анализа изображений Kodak GelLogic 2200 Imaging system с

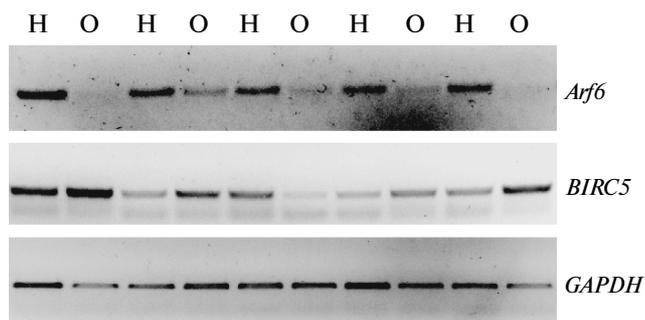


Рис. 1. Анализ экспрессии мРНК *Arf6* и *BIRC5* в опухолевой и нормальной ткани легкого методом ОТ-ПЦР. Н – условная норма, О – опухолевый образец.

последующей обработкой изображений в программе Kodak Molecular Imaging Software SE ver.5.0.1.27.

Статистическую обработку результатов независимо повторенных дважды опытов проводили с использованием программы GraphPad Prizm 5.02 (“GraphPad Software Inc.”). Статистическую значимость ассоциации клинических характеристик опухолей человека и продукции анализируемых белков определяли с использованием двухстороннего точного критерия Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Нами проанализирована экспрессия мРНК, продукция белков *Arf6*, сурвивина, а также белка *RalA* в 53 образцах НМРЛ различного генеза (24 образца АК и 29 образцов ПКРЛ).

Первоначально в части образцов (20) определили экспрессию мРНК генов *Arf6* и сурвивина (рис. 1). Снижение уровня мРНК *Arf6* обнаружено в подавляющем большинстве образцов опухолей – в 18 из 20 (90%), тогда как во всех образцах НМРЛ, за ис-

ключением одного, мы наблюдали увеличение экспрессии мРНК гена *BIRC5*. Такие изменения характерны и для ПКРЛ, и для АК, т.е. для опухолей различного гистогенеза.

Полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что снижение экспрессии мРНК *Arf6* и увеличение экспрессии мРНК *BIRC5* могут служить маркерами опухолевой трансформации при НМРЛ. Изменение уровня экспрессии мРНК некоторых генов часто говорит о нарушениях, ассоциированных с опухолевым ростом, однако количество мРНК этих генов в клетках не всегда однозначно коррелирует с количеством белковых продуктов этих генов. В связи с этим мы анализировали продукцию белков *Arf6*, сурвивина, а также белка *RalA* при НМРЛ.

Несмотря на снижение уровня мРНК *Arf6* в 90% опухолей легкого, продукция белка *Arf6* уменьшалась только в половине образцов (55%). Так, из 20 образцов, проанализированных предварительно методом ОТ-ПЦР, в 9 (45%) наблюдалось повышение продукции белка *Arf6*, в 8 (40%) содержание этого белка не изменялось, а в трех (15%) образцах снижалось. Таким образом, изменение экспрессии мРНК в образцах НМРЛ не коррелировало с изменением уровня белка *Arf6* в тех же самых образцах.

В образцах условно нормальной ткани легкого белок сурвивин практически отсутствовал, тогда как в 70% образцов НМРЛ различного генеза мы наблюдали значительную продукцию этого белка (рис. 2). Количество белка *RalA* снижалось в 64% образцов НМРЛ по сравнению с условной нормой, причем в АК это было более заметно.

Мы проанализировали продукцию как каждого из трех белков по отдельности, так и совместно в опухолях с определенными клинико-морфологическими характеристиками.

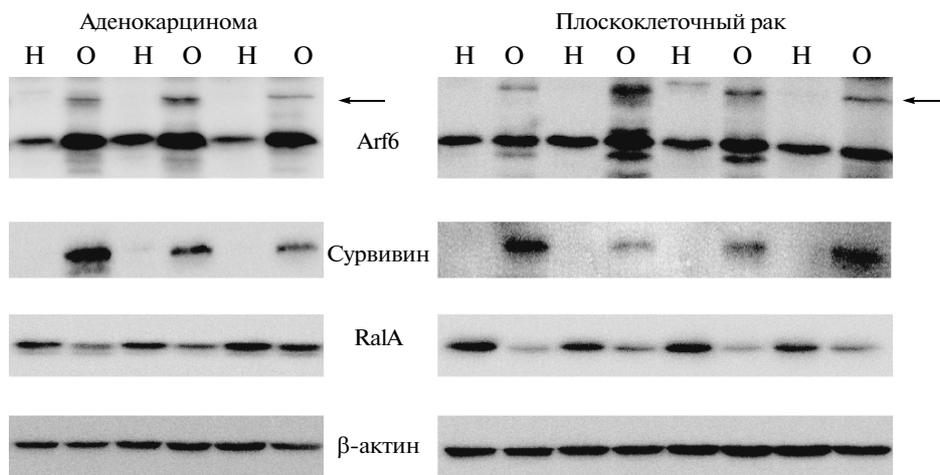


Рис. 2. Анализ продукции белков *Arf6*, *RalA* и сурвивина в опухолевой и нормальной ткани легкого методом Вестерн-блот-гибридизации. Н – условная норма; О – опухолевый образец; ← – миристилированная форма *Arf6*.

Таблица 2. Продукция белков Arf6, RalA и сурвивина в зависимости от гистологического типа немелкоклеточно-го рака легкого и стадии заболевания

Гистологический тип	Стадия	Arf6, повышение, 29/53 (55%)		RalA, снижение, 34/53 (64%)		Сурвивин, повышение, 37/53 (70%)	
АК	I–II	11/24 (46%)	6/13 (46%)	16/24 (67%)	8/13 (62%)	15/24 (63%)	8/13 (62%)
	III–IV		5/11 (45%)		8/11 (73%)		7/11 (64%)
ПКРЛ	I–II	18/29 (62%)	9/15 (60%)	18/29 (62%)	10/15 (67%)	22/29 (76%)	11/15 (73%)
	III–IV		9/14 (64%)		8/14 (57%)		11/14 (79%)

Таблица 3. Продукция белков Arf6, RalA и сурвивина при аденокарциномах в зависимости от степени дифференцировки опухоли и наличия регионарных метастазов

Клинико-морфологический критерий	Arf6			RalA			Сурвивин		
	+	–	=	+	–	=	+	–	=
у/д	7/16 44%	2/16 12%	7/16 44%	1/16 6%	10/16 63%	5/16 31%	10/16 63%	1/16 6%	5/16 31%
н/д	4/8 50%	2/8 25%	2/8 25%	–	6/8 75%	2/8 25%	5/8 63%	1/8 12%	2/8 25%
N0	5/10 50%	3/10 30%	2/10 20%	–	6/10 60%	4/10 40%	6/10 60%	1/10 10%	3/10 30%
N+	6/14 43%	1/14 7%	7/14 50%	1/14 7%	10/14 72%	3/14 21%	9/14 64%	1/14 7%	4/14 29%

Примечание. Сокращения, как в табл. 1. "+" – Повышение продукции белка; "–" – снижение продукции белка; "=" – продукция белка не изменена.

В первую очередь мы оценили продукцию белков в зависимости от гистологического типа опухоли и стадии заболевания (табл. 2).

В группе АК уровень белка Arf6 увеличивается в 46% образцов и не изменяется в 38%, в то время как в группе ПКРЛ увеличение продукции белка Arf6 фиксируется в 1.4 раза чаще (62% случаев). В трети образцов ПКРЛ количество белка Arf6 было таким же, как в образцах прилежащей к опухоли нормальной слизистой бронхов, используемой в качестве контроля. Кроме того, в некоторых образцах опухолевой ткани антитела к Arf6 выявляли дополнительную "полосу", которая, вероятно, принадлежит мистилированной форме данного белка (по данным Audrey Claing, Университет Монреаля, Монреаль, Канада) (рис. 2). Эта форма обнаружена в 37% образцов АК и в 57% случаев ПКРЛ.

Повышение уровня сурвивина мы наблюдали в 76% образцов ПКРЛ и только в 63% образцов АК. В части образцов сурвивин не выявлен ни в опухолях, ни в условно нормальных тканях (21 и 29% образцов ПКРЛ и АК соответственно).

В анализируемой выборке снижение уровня белка RalA в опухолевой ткани по сравнению с условной нормой, как и отсутствие изменения продукции RalA, в группах ПКРЛ и АК происходило практически в равных пропорциях (62 и 67% в группе ПКРЛ и 24 и 29% в группе АК (рис. 2, табл. 2).

Как видно из данных, приведенных в табл. 2, не удалось обнаружить корреляции между продукцией белков Arf6, RalA и сурвивина и стадией заболе-

вания. Это может быть связано с тем, что стадия лишь частично отражает ход заболевания, поскольку при РЛ прогрессия опухоли не всегда зависит от стадии, установленной на момент хирургического вмешательства.

При проведении клинического анализа маркеров опухолевого роста особое значение имеют корреляции между определенными молекулярными изменениями и степенью дифференцировки опухолевых клеток, а также метастатическим поражением регионарного лимфоаппарата (N+), особенно в случае так называемых "малых раков", когда размер первичного очага не превышает 2–5 см (T₁₋₂).

Поэтому на следующем этапе работы оценивали продукцию всех представленных белков в НМРЛ каждого гистологического типа по отдельности в зависимости от стадии дифференцировки опухоли и наличия регионарных метастазов в лимфатические узлы к моменту оперативного вмешательства. Такое деление позволяет выявить отдельные закономерности, характерные для двух групп НМРЛ. Полученные результаты представлены в табл. 3 (АК) и табл. 4 (ПКРЛ). Наша выборка содержала всего два образца высокодифференцированного РЛ (по одному ПКРЛ и АК), поэтому для удобства эти образцы объединили с образцами с умеренной дифференцировкой опухолевых клеток и сходным уровнем продукции анализируемых белков.

Обнаружено, что в умеренно дифференцированных АК продукция Arf6 сохраняется чаще (44%), чем в низкодифференцированных АК (25%). Не-

Таблица 4. Продукция белков Arf6, RalA и сурвивина при плоскоклеточном раке легкого в зависимости от стадии дифференцировки опухоли и наличия регионарных метастазов*

Клинико-морфологический критерий	Arf6			RalA			Сурвивин		
	+	–	=	+	–	=	+	–	=
у/д	14/22 (64%)	1/22 (4%)	7/22 (32%)	3/22 (13%)	12/22 (55%)	7/22 (32%)	17/22 (77%)	1/22 (5%)	4/22 (18%)
н/д	4/7 (57%)	1/7 (14%)	2/7 (29%)	–	6/7 (86%)	1/7 (14%)	5/7 (71%)	–	2/7 (29%)
N0	6/11 (55%)	1/11 (9%)	4/11 (36%)	1/11 (9%)	10/11 (91%)	–	8/11 (73%)	–	3/11 (27%)
N+	12/18 (67%)	1/18 (5%)	5/18 (28%)	2/18 (11%)	9/18 (50%)	7/18 (39%)	14/18 (78%)	1/18 (5%)	3/18 (17%)

* Обозначения, как в табл. 3.

ожиданно для нас тенденция к сохранению продукции Arf6 прослеживается и в образцах АК с метастазами в регионарные лимфоузлы N+ (50%), тогда как среди опухолей группы N0 таких образцов значительно меньше (20%). В группе метастазирующих ПКРЛ такие образцы составляют лишь 25%. Появление миристилированной формы белка в большей степени характерно для ПКРЛ, чем для АК (67 и 45% соответственно).

При сравнении продукции RalA в группах ПКРЛ с или без регионарных метастазов мы не обнаружили образцов N0, в которых уровень данного белка не изменялся, тогда как в группе N+ было 39% таких образцов.

Практически во всех образцах ПКРЛ, полученных от больных без регионарных метастазов, уровень белка RalA ($p = 0.01$) статистически значимо снижен по сравнению с группой больных с верифицированными метастазами в лимфоузлы. В случае АК такой корреляции не выявлено. Напротив, следует отметить, что в группе АК наблюдается обратная тенденция, а именно: продукция RalA, как и Arf6, сохраняется в образцах опухолей без метастазов (40%), в отличие от группы N+ (21%).

Нами выявлено незначительное количество образцов, в которых повышен уровень белка RalA или снижена продукция сурвивина, причем во всех этих образцах наблюдается высокий уровень Arf6. Снижение уровня сурвивина обнаружено в трех образцах опухолей разного гистологического типа и степени дифференцировки, оно сопровождается не только повышением содержания Arf6 и появлением его миристилированной формы, но и снижением уровня белка RalA. Любопытно, что все четыре опухоли с повышенным уровнем белка RalA, хотя и от-

носятся к умеренно дифференцированным, но три из них характеризуются метастатическим поражением лимфатической системы, а один имеет классификацию $T_2N_0M_0$, т.е. принадлежит к опухолям, метастатический потенциал которых на данном этапе заболевания может быть не известен, так называемых “малых раков”. Доля “малых раков” в нашей выборке составила 68% (36/53).

В общей выборке нами выделено 18 образцов, относящихся к группе “малых раков” с агрессивным течением ($T_{1-2}N_{1-2}M_0$). У больных этой группы обнаружены метастатические поражения регионарных лимфоузлов первого и/или второго порядка при первичной опухоли, не превышающей 3 см в диаметре. Доля таких больных и в группе опухолей плоскоклеточного генеза, и в группе АК составила около 30% (9/29–31 и 9/24–38% соответственно). В 44% (8/18) образцов данного типа мы выявили миристилированную форму Arf6. В этой группе образцов также наблюдаются различия в продукции анализируемых белков. Так, в 67% (12/18) опухолей увеличено количество белка Arf6, причем в образцах этой группы, относящихся к ПКРЛ, этот показатель достигает 88% (8/9). В группе плоскоклеточных “малых раков” без метастазов ($T_{1-2}N_0M_0$) продукция белка Arf6 увеличена только в 38% образцов (3/8) (см. табл. 5).

Интересная закономерность наблюдалась в случае белка RalA – снижение его уровня обнаружено всего в 44% (8/18) образцов из всей группы “малых раков” с агрессивным течением, против 72% в группе $T_{1-2}N_0M_0$. В группе ПКРЛ категории $T_{1-2}N_{1-2}M_0$ мы обнаружили только два образца со сниженным уровнем RalA, причем оба они принадлежали к низкодифференцированным ПКРЛ, для которых характерно именно снижение продукции белка RalA (см. табл. 5).

Таким образом, снижение уровня продукции белка RalA ($p = 0.015$) и повышение уровня Arf6 ($p = 0.049$) статистически значимо различаются в группах $T_{1-2}N_0M_0$ и $T_{1-2}N_{1-2}M_0$ ПКРЛ соответственно.

Продукция сурвивина увеличивается в 75–77% образцов, что соответствует средним значениям этого показателя во всей группе НМРЛ.

Таблица 5. Продукция Arf6 и RalA в группе “малых раков” плоскоклеточного генеза

Группа “малых раков”	RalA, снижение	Arf6, повышение	Сурвивин, повышение
$T_{1-2}N_0M_0$	(88%) 7/8	(38%) 3/8	(75) 6/8
$T_{1-2}N_{1-2}M_0$	(22%) 2/9	(88%) 8/9	(77) 7/9

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Поиск маркеров прогноза и течения НМРЛ — одно из важнейших направлений молекулярной онкологии, которое успешно развивается в последнее время. Найдено достаточно большое количество белков, потенциально ассоциированных с прогрессией НМРЛ.

Ранее в качестве потенциального маркера прогноза и течения НМРЛ активно изучали только один из рассматриваемых нами белков, а именно, сурвивин. Сейчас мало известно о связи между содержанием сурвивина в клетке и плохим прогнозом при АК различной локализации. Необходимо учитывать данные о совместной продукции сурвивина и других белков, например, циклина D1, интегрин- β 1 и фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF) [21]. Об ассоциации продукции и локализации сурвивина с параметрами прогрессии НМРЛ и выживаемости больных говорят результаты различных исследований [14, 15]. Опубликованы также данные о корреляции между повышенной продукцией сурвивина и прогнозом при ПКРЛ, но не АК [22].

Нами предпринята попытка найти возможную связь между тремя белками: Arf6, сурвивином и RalA, потенциально ассоциированными с прогнозом при НМРЛ и, вероятно, вовлеченными в один сигнальный каскад PLD-mTOR.

Существует предположение, что повышение уровня белка Arf6 может быть ассоциировано с увеличенной инвазивной способностью и степенью злокачественности некоторых линий рака молочной железы [23]. Кроме того, повышенную экспрессию мРНК белков, активирующих Arf6, наблюдали в образцах высоко- и низкодифференцированных глиом [24]. Уровень белка Arf6 в контексте прогрессии РЛ человека до сих пор не определяли. Оказалось, что количество белка Arf6 возрастало в 55% всех использованных нами образцов НМРЛ — в 62% ПКРЛ и менее чем в половине АК (46%). Увеличение числа образцов ПКРЛ с повышенной продукцией белка Arf6 может говорить о большей вовлеченности этого белка в развитие ПКРЛ, чем АК. В пользу этого предположения свидетельствуют также результаты изучения группы “малых раков” с различным метастатическим статусом и более частое появление миристилированной формы Arf6 при ПКРЛ. Наша гипотеза находит подтверждение в недавно опубликованных данных [25] о преимущественной активации сигнального пути с участием Arf6 в кератиноцитах. Вероятно, увеличение продукции белка Arf6 в большей степени характерно для опухолей плоскоклеточного генеза.

Определение экспрессии Arf6 не выявило зависимости между уровнем мРНК и белка, что согласуется с полученными на линиях рака молочной железы данными, которые также говорят об отсутствии связи между уровнем мРНК и белка Arf6 и инвазивным потенциалом клеток [23]. Снижение количества

мРНК Arf6 и повышение уровня белка Arf6 в образцах опухолей по сравнению с нормальной тканью указывает на возможность быстрого оборота мРНК с ее последующей деградацией, а также, по-видимому, и на регуляцию количества белка на посттранскрипционном уровне. Следует учитывать и тот факт, что активность Arf6 зависит от его связывания с GTP и продукции белков GEF и GAP.

Ранее сотрудники нашей лаборатории показали, что зависимость от H-Ras стимуляция метастатической активности трансформированных вирусом саркомы Рауса (RSV, Rous sarcoma virus) эмбриональных фибробластов хомяка зависит от активации сигнального пути с участием белков GEF для Ral [19]. Кроме того, активация белка RalA приводит к стимуляции метастатической активности клеток [19]. На моделях *in vivo* показано, что белки семейства Ral участвуют в стимуляции процессов метастазирования при раке предстательной железы и мочевого пузыря [18, 20].

В представленной работе показано, что в нашей выборке продукция белка RalA снижена в 67 и 62% образцов АК и ПКРЛ соответственно. Следовательно, никаких различий, связанных с гистологическим типом опухоли, выявить не удалось. В целом, снижение продукции RalA в 64% НМРЛ говорит о том, что этот белок не вовлечен в прогрессию НМРЛ в той же степени, в какой в ней участвуют Arf6 и сурвивин. Тем не менее, очевидно, что снижение количества белка RalA связано с прогрессией НМРЛ. Интересно, что во всех 11 образцах АК, в которых повышена продукция белка Arf6, продукция RalA снижалась или не изменялась. В образцах ПКРЛ с повышенным уровнем белка RalA обнаружено синхронное повышение продукции Arf6. Ввиду малого числа таких образцов сложно делать какие-либо выводы о существовании связи между продукцией Arf6 и RalA. Однако можно предположить, что отсутствие образцов с увеличенным уровнем как Arf6, так и RalA в группе АК и присутствие таких образцов в группе ПКРЛ говорит о возможности различной регуляции этих белков в опухолях данных гистологических групп. Принимая во внимание, что оба белка совместно активируют PLD, можно предположить, что в АК PLD “уходит” от полной активации этими белками, возможной в ПКРЛ. В качестве альтернативного объяснения данного факта можно говорить о том, что в прогрессию АК вовлечены и другие белки, и сигнальные каскады помимо RalA-PLD. Все образцы, в которых повышена продукция обоих белков одновременно, относятся к умеренно дифференцированному ПКРЛ с ороговением. Кроме того, снижение продукции белка RalA в 91% образцов ПКРЛ, полученных от больных без метастазов, против 50% образцов ПКРЛ от больных с метастазами, также свидетельствует в пользу того, что повышение уровня RalA и, возможно, стимуляция активности PLD могут приводить к стимуляции процесса метастазирования при ПКРЛ. В случае АК такой

корреляции не выявлено, скорее наоборот – продукция RalA снижается в 60% АК, полученных от больных без метастазов, и в 72% АК от больных с метастазами. Возможно, в АК RalA выполняет иные функции. Отсутствие образцов с повышенным уровнем одновременно Arf6 и RalA и снижение продукции RalA в 72% образцов метастазирующих опухолей свидетельствует скорее об иных механизмах регуляции прогрессии в АК. Об этом же свидетельствуют результаты изучения ПКРЛ ранних стадий развития.

Белок сурвивин активно изучали в качестве возможного маркера прогрессии опухолей различного генеза. Увеличение количества сурвивина в 70% НМРЛ в целом свидетельствует о том, что этот белок можно отнести к маркерам данного заболевания, что согласуется с результатами [26]. Полученные нами данные позволяют говорить о том, что повышение продукции белка сурвивина в ПКРЛ происходит несколько чаще, чем в АК (76 и 63% соответственно). Однако корреляций с дифференцировкой, стадией или наличием метастазов обнаружить не удалось. Уровень мРНК *BIRC5* возрастает не только во всех образцах с повышенным уровнем белка, но и в тех образцах, где продукция сурвивина понижается. Поэтому можно предположить, что регуляция синтеза сурвивина осуществляется на посттранскрипционном уровне.

Мы не обнаружили статистически значимой связи между изменением продукции белков Arf6, сурвивина и RalA между собой. Интересно, что из 11 образцов ПКРЛ, в которых продукция белка Arf6 снижалась или не изменялась, в 9 (82%) наблюдалось увеличение продукции сурвивина. При этом продукция сурвивина возрастала в 7 из 13 (54%) образцов АК, в которых не отмечено повышения уровня Arf6.

Таким образом, Arf6, сурвивин и RalA потенциально могут служить независимыми маркерами НМРЛ, причем продукция белков Arf6 и сурвивина повышается при прогрессии опухоли и в большей степени ассоциирована с прогрессией ПКРЛ, тогда как уровень белка RalA снижается независимо от гистологического типа опухоли. На наш взгляд, обнаруженная статистически достоверная зависимость между снижением продукции RalA и отсутствием метастазов при ПКРЛ заслуживает пристального внимания, особенно на ранних стадиях заболевания, когда метастатический потенциал опухоли не может быть определен клинически.

Для объяснения полученных результатов необходимы не только дальнейшие исследования *in vitro*, которые позволят расширить знания о взаимной регуляции белков Arf6, RalA и сурвивина, но и масштабные скрининговые исследования клинического материала для подтверждения обнаруженных тенденций и закономерностей. Безусловно, изучение данных белков в контексте течения и

прогноза НМРЛ, сопоставление с мутационным статусом генов семейства *Ras* и продукцией других белков, ассоциированных с развитием и прогрессией РЛ, необходимо для четкого понимания причин прогрессии заболевания и поиска эффективных противоопухолевых средств.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной программы “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы” (государственный контракт № 02.522.11.2005), Федеральной программы “Научно-образовательные центры” (государственный контракт № 02.740.11.0085) и ЗАО Центр внедрения ПРОТЕК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Feig L.A. 2003. Ral-GTPases: approaching their 15 minutes of fame. *Trends Cell Biol.* **13**, 419–425.
2. Souza-Schorey C., Chavrier P. 2006. ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 347–358.
3. Kahn R.A., Cherfils J., Elias M., Lovering R.C., Munro S., Schurmann A. 2006. Nomenclature for the human Arf family of GTP-binding proteins: ARF, ARL, and SAR proteins. *J. Cell Biol.* **172**, 645–650.
4. Brown H.A., Gutowski S., Moomaw C.R., Slaughter C., Sternweis P. C. 1993. ADP-ribosylation factor, a small GTP-dependent regulatory protein, stimulates phospholipase D activity. *Cell.* **75**, 1137–1144.
5. Paris S., Beraud-Dufour S., Robineau S., Bigay J., Antony B., Chabre M., Chardin P. 1997. Role of protein-phospholipid interactions in the activation of ARF1 by the guanine nucleotide exchange factor Arno. *J. Biol. Chem.* **272**, 22221–22226.
6. Souza-Schorey C., Stahl P.D. 1995. Myristoylation is required for the intracellular localization and endocytic function of ARF6. *Exp. Cell Res.* **221**, 153–159.
7. Xu L., Frankel P., Jackson D., Rotunda T., Boshans R.L., Souza-Schorey C., Foster D.A. 2003. Elevated phospholipase D activity in H-Ras- but not K-Ras-transformed cells by the synergistic action of RalA and ARF6. *Mol. Cell Biol.* **23**, 645–654.
8. Foster D.A., Xu L. 2003. Phospholipase D in cell proliferation and cancer. *Mol. Cancer Res.* **1**, 789–800.
9. Shi M., Zheng Y., Garcia A., Xu L., Foster D.A. 2007. Phospholipase D provides a survival signal in human cancer cells with activated H-Ras or K-Ras. *Cancer Lett.* **258**, 268–275.
10. Zhao Y., Ehara H., Akao Y., Shamoto M., Nakagawa Y., Banno Y., Deguchi T., Ohishi N., Yagi K., Nozawa Y. 2000. Increased activity and intranuclear expression of phospholipase D2 in human renal cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **278**, 140–143.
11. Noh D.Y., Ahn S.J., Lee R.A., Park I.A., Kim J.H., Suh P.G., Ryu S.H., Lee K.H., Han J. S. 2000. Overexpression of phospholipase D1 in human breast cancer tissues. *Cancer Lett.* **161**, 207–214.
12. Chen Y., Rodrik V., Foster D.A. 2005. Alternative phospholipase D/mTOR survival signal in human breast cancer cells. *Oncogene.* **24**, 672–679.

13. Vaira V., Lee C.W., Goel H.L., Bosari S., Languino L.R., Altieri D. C. 2007. Regulation of survivin expression by IGF-1/mTOR signaling. *Oncogene*. **26**, 2678–2684.
14. Altieri D. C. 2008. Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery. *Nat. Rev. Cancer*. **8**, 61–70.
15. Krepela E., Dankova P., Moravcikova E., Krepelova A., Prochazka J., Cermak J., Schutzner J., Zatloukal P., Benkova K. 2009. Increased expression of inhibitor of apoptosis proteins, survivin and XIAP, in non-small cell lung carcinoma. *Int. J. Oncol.* **35**, 1449–1462.
16. Вайшла Н.А., Зиновьева М.В., Сасс А.В., Копанцев Е.П., Виноградова Т.В., Свердлов Е.Д. 2008. Увеличение экспрессии гена *BIRC5* при плоскоклеточном раке легкого и пищевода не коррелирует с экспрессией генов *SMAC/DIABLO* и *PML*, кодирующих его ингибиторы. *Молекуляр. биология*. **42**, 652–661.
17. Mehrotra S., Languino L.R., Raskett C.M., Mercurio A.M., Dohi T., Altieri D. C. 2010. IAP regulation of metastasis. *Cancer Cell*. **17**, 53–64.
18. Smith S.C., Oxford G., Baras A.S., Owens C., Havaleshko D., Brautigan D.L., Safo M.K., Theodorescu D. 2007. Expression of Ral GTPases, their effectors, and activators in human bladder cancer. *Clin. Cancer Res.* **13**, 3803–3813.
19. Tchekina E., Agapova L., Dyakova N., Martinjuk A., Komelkov A., Tatosyan A. 2005. The small G-protein RalA stimulates metastasis of transformed cells. *Oncogene*. **24**, 329–335.
20. Yin J., Pollock C., Tracy K., Chock M., Martin P., Oberst M., Kelly K. 2007. Activation of the RalGEF/Ral pathway promotes prostate cancer metastasis to bone. *Mol. Cell Biol.* **27**, 7538–7550.
21. Oshita F., Ito H., Ikehara M., Ohgane N., Hamanaka N., Nakayama H., Saito H., Yamada K., Noda K., Mitsuda A., Kameda Y. 2004. Prognostic impact of survivin, cyclin D1, integrin beta1, and VEGF in patients with small adenocarcinoma of stage I lung cancer. *Am. J. Clin. Oncol.* **27**, 425–428.
22. Kren L., Brazdil J., Hermanova M., Goncharuk V.N., Kallakury B.V., Kaur P., Ross J. S. 2004. Prognostic significance of anti-apoptosis proteins survivin and bcl-2 in non-small cell lung carcinomas: a clinicopathologic study of 102 cases. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* **12**, 44–49.
23. Hashimoto S., Onodera Y., Hashimoto A., Tanaka M., Hamaguchi M., Yamada A., Sabe H. 2004. Requirement for Arf6 in breast cancer invasive activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **101**, 6647–6652.
24. Li M., Wang J., Ng S.S., Chan C.Y., He M.L., Yu F., Lai L., Shi C., Chen Y., Yew D.T., Kung H.F., Lin M. C. 2009. Adenosine diphosphate-ribosylation factor 6 is required for epidermal growth factor-induced glioblastoma cell proliferation. *Cancer*. **115**, 4959–4972.
25. Frasa M.A., Maximiano F.C., Smolarczyk K., Francis R.E., Betson M.E., Lozano E., Goldenring J., Seabra M.C., Rak A., Ahmadian M.R., Braga V.M. 2010. Armus is a Rac1 effector that inactivates Rab7 and regulates E-cadherin degradation. *Curr. Biol.* **20**, 198–208.
26. Monzo M., Rosell R., Felip E., Astudillo J., Sanchez J.J., Maestre J., Martin C., Font A., Barnadas A., Abad A. 1999. A novel anti-apoptosis gene: re-expression of survivin messenger RNA as a prognosis marker in non-small-cell lung cancers. *J. Clin. Oncol.* **17**, 2100–2104.