

УДК 577.29

doi: 10.26907/2542-064X.2020.1.123-133

**NEDD9 РЕГУЛИРУЕТ МЕТАСТАЗИРОВАНИЕ
НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО ЗА СЧЕТ
АКТИВАЦИИ ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНОГО
ПЕРЕХОДА И МИГРАЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ
ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК**

*Ю.А. Топчу, А.М. Мазитова, М.В. Тихомирова,
З.И. Абрамова, А.Я. Денека*

Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

Аннотация

В статье представлены результаты исследования механизмов регуляции роста и метастазирования немелкоклеточного рака легкого онкогенным белком Nedd9 с использованием трансгенной мышинной модели аденокарциномы легкого. Показано, что при активации опухолевого образования в легких мышей на фоне полностью «выключенного» *Nedd9* у животных наблюдаются усиление злокачественности течения заболевания и повышение метастатической способности опухолевых клеток и показан механизм, лежащий в основе данных наблюдений. Сделано предположение, что отсутствие активности белка Nedd9 на ранних этапах развития опухоли, включая момент опухолевой трансформации клетки, позволяет опухолевым клеткам приобретать мезенхимальные свойства, такие как повышенная подвижность и способность к инвазии, за счет компенсаторного перестроения внутриклеточных белковых сигнальных путей и активации эпителиально-мезенхимального перехода.

Ключевые слова: рак легкого, метастазирование, эпителиально-мезенхимальный переход, иммуногистохимия, трансгенная мышинная модель

Введение

В настоящее время смертность от рака легкого занимает лидирующее место среди всех онкологических заболеваний и зачастую ассоциируется с рефрактерными к лечению дистальными метастазами [1]. Представляемое исследование направлено на выявление механизмов, за счет которых поддерживающий белок Nedd9 (Neural precursor cell expressed, Developmentally Down-regulated 9) регулирует инвазию и метастазирование немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ). Метастазы являются проявлением наиболее агрессивного типа этого заболевания и зачастую ассоциируются с устойчивостью к химиотерапии. Биологический механизм, за счет которого Nedd9 регулирует рост, инвазию и метастазирование НМРЛ, мало изучен, а его изучение имеет не только фундаментальное значение – открытие новых механизмов развития опухоли, но и практическую ценность: оценка уровня активности Nedd9 в опухолях пациентов может служить предиктором ответа на химиотерапевтическое воздействие.

Nedd9 является поддерживающим белком в множестве внутриклеточных белковых каскадов. В литературе описаны механизмы регуляции белком Nedd9 сигнальных путей интегринов, SRC-киназы, киназы фокальной адгезии (ФАК) и нижележащих путей PI3K-AKT-mTOR, Ras-ERK, играющих ключевые роли в росте и прогрессировании множества опухолей а также активации эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) [2–4]. Высокие уровни белка Nedd9 зачастую ассоциируются с метастазами и прогрессированием НМПЛ, а также некоторых других онкологических заболеваний [5–9].

Наиболее частыми причинами возникновения НМПЛ у человека являются активирующая мутация *Kras* (около 30%) [10], а также потеря аллеля *Trp53* (около 60% случаев) [11]. Обнаружение этих мутаций позволило создать удобный инструмент для изучения роста и метастазирования немелкоклеточного рака легкого – мышиную модель, трансгенную по *Kras/p53*. У этих мышей введенный мутантный аллель *Trp53* сочетается с активирующей мутацией аллеля *Kras*, что приводит к развитию опухолей в легком, по патоморфологическим свойствам схожих с аденокарциномой человека. В литературе также описана трансгенная мышинная модель полного нокаута *Nedd9* [12]. У этих мышей наблюдается полный нокаут аллелей во всем организме, однако спонтанного опухолеобразования на этом фоне не наблюдается. В настоящем исследовании нами была использована мышинная модель, полученная путем скрещивания мышей трансгенных по *Kras/Trp53* и трансгенных по *Nedd9* (*Kras/Trp53/Nedd9*). Модель была описана ранее [13].

С использованием описанной модели нами впервые была исследована роль белка Nedd9 в регулировании ЭМП и метастазирования рака легкого с момента инициации опухолевой трансформации. Было обнаружено, что при активации опухолевого образования на фоне полностью «выключенного» *Nedd9* у животных наблюдаются усиление злокачественности течения заболевания и повышение метастатической способности опухолевых клеток. Установлено, что механизмом, лежащим в основе ухудшения прогноза заболевания, является компенсаторное изменение во внутриклеточных белковых сигнальных путях – усиление процессов ЭМП и подвижности клеток. Полученные результаты являются новыми и в литературе не описаны.

1. Материалы и методы

1.1. Мышиная модель. В настоящем исследовании использовалась мышинная модель, полученная путем скрещивания мышей линии B6.129S/S4-Krastm4Tuj/J/B6.129P2-Trp53tm1Vtn с мышами трансгенными по *Nedd9*. Исследование проводилось в соответствии с этическими нормами, одобренными Локальным этическим комитетом КФУ (приказ № 0.1.1.67-06/209-л/16 от 12 декабря 2016 г.)

Аденовирусная активация онкогенного *KrasG12D* и инактивация *Trp53* была индуцирована посредством введения 9-недельным мышам $2.5 \cdot 10^6$ аденовирусных частиц, несущих *Cre*-рекомбиназу (Ulowa-4, Центр вирусных векторов Университета Айовы, Айова Сити, Айова, США) в 75 мкл среды MEM с 0.01 M CaCl_2 , в трахею способом обычной ингаляции у анестезированных мышей с использованием стандартных методик [13]. Образование опухолей легкого было

подтверждено через 12 недель после активации и контролировалось с помощью магнитно-резонансной томографии (МРТ).

1.2. МРТ легких мышей. Для проведения МРТ мышей первоначально анестезировали 2%-ным изофлураном в кислородной смеси, во время сканирования животные находились под действием 0.5%-ного изофлурана. Сканирование проводилось с помощью магнитного спектрометра Bruker DRX300 мощностью 7 Tesla на программном обеспечении ParaVision 3.0.2 (Bruker, Биллерика, Массачусетс, США) и одной настроенной цилиндрической радиочастотной катушки 1 Н. Для измерения объема опухолей в легком проводился с помощью обведения области опухоли вручную в серии соседних изображений с использованием программного обеспечения ImageJ (Национальный институт здоровья, Бетесда, Мэриленд, США). Расчет объема опухоли производился путем умножения толщины фрагмента изображения на площадь опухоли и суммированием для каждой мыши.

1.3. Подготовка и иммуногистохимическое окрашивание образцов опухолей и метастазов мышей. Образцы тканей легких и опухолей собирались и фиксировались в 10%-ном растворе формальдегида в фосфатном буфере в течение 24–48 ч, затем дегидратировались для получения парафиновых блоков. Дегидратирование тканей было проведено путем обработки в серии растворов этанола и ксилена (70%-ный этанол – 3 ч, 95%-ный этанол – 2 ч, 100% -ный этанол – 2 ч, этанол – ксилен – 2 ч, ксилен – 3 ч), после чего они погружались в парафин.

Парафиновые срезы толщиной 5 мкм были наложены на предметные стекла, после чего хранились при комнатной температуре до использования. Готовые образцы анализировались после гематоксилин-эозинового окрашивания по стандартному протоколу (Sigma-Aldrich, Сэнт Луис, Монтана, США). Иммуногистохимическое окрашивание срезов опухолей проводилось первичными антителами к виментину (№3 932, Cell Signaling, Беверли, Массачусетс, США) и маркером макрофагов F4-80 (sc-377009, Santa Cruz, Даллас, Техас, США) и вторичными антителами к кролику Alexafluor 488 tagged и вторичными антителами к мыши Alexafluor 594 (Life Technologies, Юджин, Орегон, США). На конечном этапе слайды были зафиксированы раствором Vectashield с DAPI (4', 6-диамидино-2-фенилиндола) (H-1200, Vector Labs, Бурлинггэм, Калифорния, США) для визуализации ДНК.

1.4. Иммуноблоттинг и антитела. Для анализа уровня экспрессии белков методом вестерн-блот использовали тканевые лизаты. Все этапы проводили при 4 °С. Ткани опухолей легких от четырех мышей в каждой группе лизировали в буфере T-PER (Sigma, США) с добавлением ингибиторов протеаз и фосфатаз в 1%-ной концентрации. Концентрацию белка в лизатах определяли по методу Лоури. Затем выравнивали концентрацию образцов добавлением лизирующего буфера до концентрации наиболее разбавленного. После этого лизаты кипятили в растворе 2%-ного додецилсульфата натрия (SDS) в течение 10 мин для полной денатурации белков. Далее образцы разгоняли методом электрофореза в градиентном (4–12%) полиакриламидном геле при 120 В. С геля белки переносили на поливинилиденфторидную (PVDF) мембрану методом электроблот-

тинга при напряжении 20 В в течение 3 ч. Мембрану с белками инкубировали в течение часа в блокирующем буфере Super Block (Sigma-Aldrich, США). После этого мембрану инкубировали с первичными антителами в конечной концентрации 100 нг/мл в течение 12–24 ч при 4 °С, разведенными в блокирующем буфере. Были использованы первичные антитела к виментину (№ 3932, Cell Signaling, Беверли, Массачусетс, США) и β-актину (ab8227, Abcam, Кембридж, Великобритания). Мембрану отмывали в TBS-T три раза по 5 мин и в течение 1 ч инкубировали с вторичными антителами, которые были конъюгированы с пероксидазой хрена (HRP). Вторичные антитела разводили в блокирующем буфере в концентрации 1 мкг/мл. По окончании инкубации мембраны отмывали три раза по 5 мин в TBS-T. Белки визуализировали с использованием реакции пероксидазы хрена и ее субстрата, приготовленного как смесь растворов SuperSignal West Pico Stable Peroxide Solution и SuperSignal West Pico Luminol Enhancer Solution с помощью светочувствительной пленки. Полученные пленки сканировались.

2. Результаты и их обсуждение

С целью изучения роли белка Nedd9 в регулировании ЭМП и метастазирования рака легкого с момента инициации опухолевой трансформации нами была использована порода мышей, трансгенных по *Kras/p53/Nedd9*. После инициирования роста опухолей в легких животных мы следили за развитием опухолей с помощью магнитно-резонансного томографического сканирования (рис. 1, а). Было обнаружено, что у животных с «выключенным» *Nedd9* опухоли достигали большего размера, а также росли быстрее по сравнению с контрольной группой – мышами с неизменным *Nedd9* (рис. 1, б).

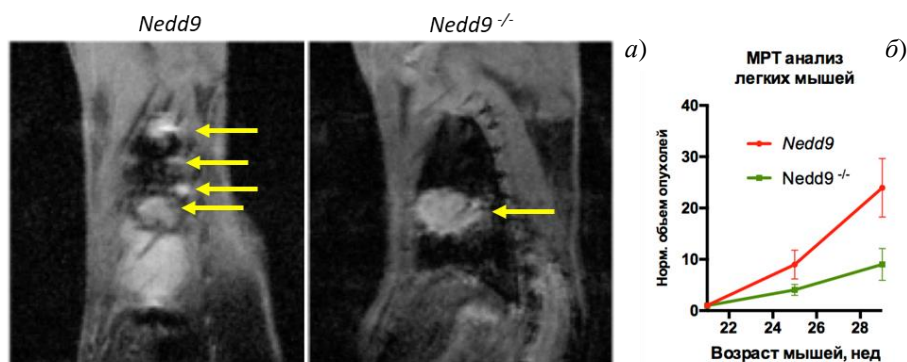


Рис. 1. Сравнительный анализ опухолевой нагрузки в легких мышей с интактным *Nedd9* и «выключенным» *Nedd9* (*Nedd9^{-/-}*). Репрезентативные изображения (а) и график (б), демонстрирующий объем опухолей, на основании МРТ-сканов легких мышей в возрасте 29 недель. Опухоли отмечены стрелками

На следующем этапе исследования нами были получены срезы ткани органов грудной полости мышей (легкие, сердце, тимус) и проведено патоморфологические исследования. С помощью окраски гематоксилин-эозином обнаружено,

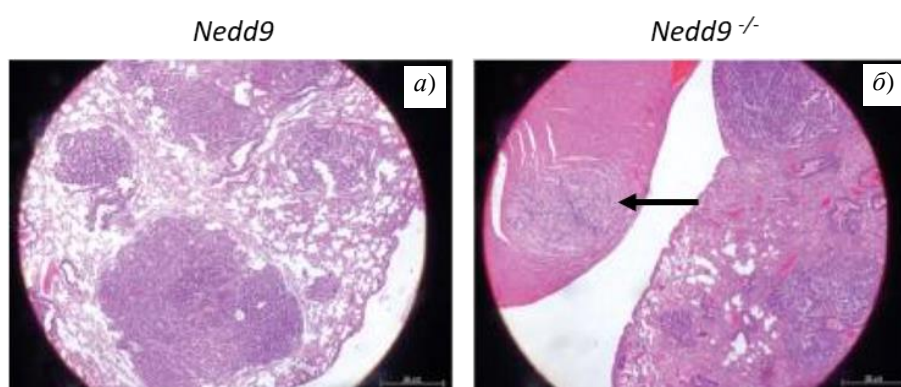


Рис. 2. Гематоксилин-эозин окрашенные срезы опухолей в ткани легких мышей с интактным *Nedd9* и «выключенным» *Nedd9* (*Nedd9*^{-/-}). Стрелкой отмечено место инвазии опухоли в ткань сердца

что помимо большей опухолевой нагрузки у некоторых животных с «выключенным» *Nedd9* имелись метастазы в плевру и признаки прямой инвазии в сердечную ткань (рис. 2), чего не наблюдалось в контрольной группе. Сами опухоли имели больший размер.

В работе [7] белок *Nedd9* описан как регулятор ЭМП, и нами было выдвинуто предположение, что в клетках опухолей мышей с «выключенным» *Nedd9* будет отмечаться повышенная экспрессия мезенхимальных маркеров. Окрашивание срезов ткани с помощью метода флуоресцентного иммуногистохимического окрашивания на мезенхимальный маркер виментин показало, что на периферии опухолевых образований в легких мышей с «выключенным» *Nedd9* отмечается большое количество клеток амeboидной формы (рис. 3, а). Данное наблюдение было подтверждено с помощью метода вестерн-блот с использованием лизатов, полученных из опухолевой ткани мышей. Обнаружено, что у животных с нокаутом *Nedd9* уровни виментина значительно повышены (рис. 3, б). Таким образом, можно сделать вывод, что опухолевая трансформация и инициация роста опухолей на фоне «выключенного» *Nedd9* приводят к селекции мезенхимальной субпопуляции опухолевых клеток и, следовательно, к усилению инвазивной способности НМРЛ.

Заключение

В ряде работ (см., например, [9, 14, 15]) для уменьшения уровня экспрессии белка *Nedd9* в клеточных линиях НМРЛ применялись методы технологии РНК-интерференции, после чего наблюдалось уменьшение инвазии и роста опухолевых клеток и ксенографтов. Наши результаты, полученные от мышинной модели аденокарциномы легкого с более физиологичным абсолютным «выключением» *Nedd9* до момента инициации опухолевого процесса, демонстрируют противоположные результаты.

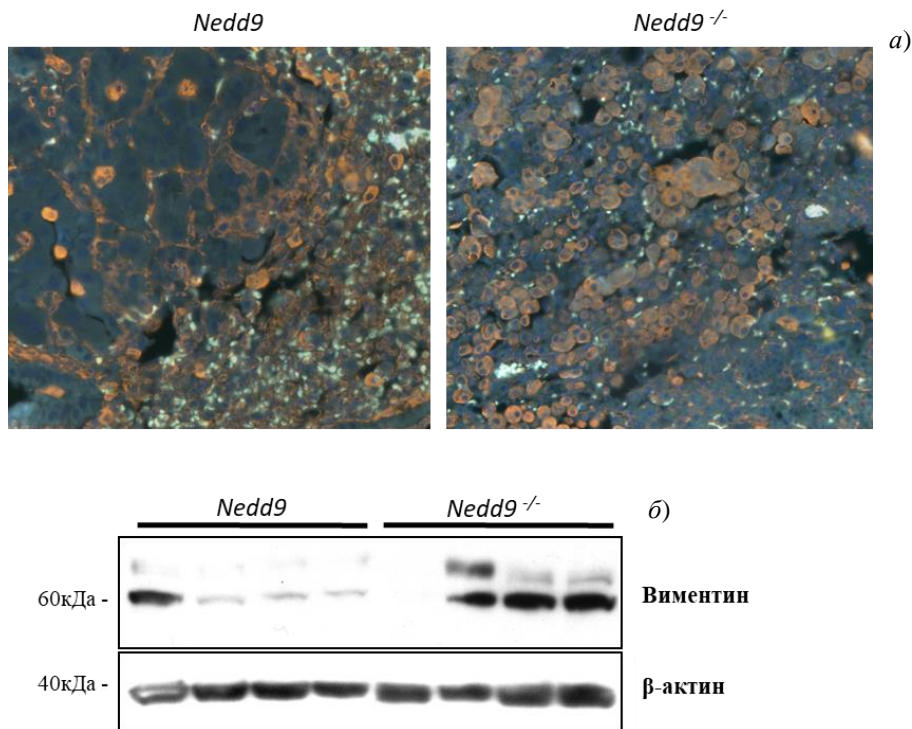


Рис. 3. Отсутствие белка Nedd9 повышает метастатическую активность опухолевых клеток за счет активации эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП). *а*) Иммунофлюоресцентное иммуногистохимическое окрашивание срезов опухолей в ткани легких мышей с интактным *Nedd9* и «выключенным» *Nedd9* (*Nedd9*^{-/-}) на мезенхимальный маркер виментин (оранжевый), маркер макрофагов F4-80 (зеленый) и DAPI (синий). *б*) Вестерн-блот-анализ на маркер ЭМП виментин в лизатах опухолевой ткани мышей (от 4 мышей с «выключенным» *Nedd9* и 4 контрольных мышей)

На основании собственных результатов и опубликованных данных нами сделан вывод, что отсутствие активности белка Nedd9 на ранних этапах развития опухоли, включая момент опухолевой трансформации клетки, приводит к компенсаторному перестроению внутриклеточных белковых сигнальных путей и в конечном итоге вызывает более злокачественное прогрессирование заболевания. Метастазирование опухолевых клеток усиливается за счет приобретения опухолевыми клетками мезенхимальных свойств и усиления процесса эпителиально-мезенхимального перехода. Мы предполагаем, что белок Nedd9 играет важную роль в процессе развития опухоли от момента инициации ее роста. Эта роль отличается от таковой в уже сформированных опухолях (будь то клеточные линии или ксенографты) и ранее не описана в литературе.

Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФ в рамках научного проекта № 18-75-00104. Часть работы выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

Информация о вкладе авторов. Топчу Юлия Алексеевна – проведение экспериментальных исследований, анализ и интерпретация полученных данных, работа с текстом статьи; Мазитова Александра Маратовна – проведение экспериментальных исследований, анализ и интерпретация полученных данных, работа с текстом статьи; Тихомирова Мария Владимировна – проведение экспериментальных исследований, анализ полученных данных; Абрамова Зинаида Ивановна – редактирование и обсуждение текста статьи; Денека Александр Ярославович – постановка проблемы исследования, концептуализация выводов, написание первоначального варианта текста.

Литература

1. Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. Cancer statistics, 2017 // *Ca-Cancer J. Clin.* – 2017. – V. 67, No 1. – P. 7–30. – doi: 10.3322/caac.21387.
2. Greuber E.K., Smith-Pearson P., Wang J., Pendergast A.M. Role of ABL family kinases in cancer: From leukemia to solid tumors // *Nat. Rev. Cancer.* – 2013. – V. 13, No 8. – P. 559–571. – doi: 10.1038/nrc3563.
3. Law S.F., Estojak J., Wang B., Mysliwiec T., Kruh G., Golemis E.A. Human enhancer of filamentation 1, a novel p130^{cas}-like docking protein, associates with focal adhesion kinase and induces pseudohyphal growth in *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol. Cell. Biol.* – 1996. – V. 16, No 7. – P. 3327–3337. – doi: 10.1128/MCB.16.7.3327.
4. Pugacheva E.N., Jablonski S.A., Hartman T.R., Henske E.P., Golemis E.A. HEF1-dependent Aurora A activation induces disassembly of the primary cilium // *Cell.* – 2007. – V. 129, No 7. – P. 1351–1363. – doi: 10.1016/j.cell.2007.04.035.
5. Morimoto K., Tanaka T., Nitta Y., Ohnishi K., Kawashima H., Nakatani T. NEDD9 crucially regulates TGF-beta-triggered epithelial-mesenchymal transition and cell invasion in prostate cancer cells: Involvement in cancer aggressiveness // *Prostate* – 2014. – V. 74, No 8. – P. 901–910. – doi: 10.1002/pros.22809.
6. Feng Y., Wang Y., Wang Z., Fang Z., Li F., Gao Y., Liu H., Xiao T., Li F., Zhou Y., Zhai Q., Liu X., Sun Y., Bardeesy N., Wong K.-kin., Chen H., Xiong Zh.-qi., Ji H. The CRTC1-NEDD9 signaling axis mediates lung cancer progression caused by LKB1 loss // *Cancer Res.* – 2012. – V. 72, No 24. – P. 6502–6511. – doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1909.
7. Miao Y., Li A.-L., Wang L., Fan Ch.-F., Zhang X.-P., Xu H.-T., Yang L.-H., Liu Y., Wang E.-H. Overexpression of NEDD9 is associated with altered expression of E-Cadherin, β -Catenin and N-Cadherin and predictive of poor prognosis in non-small cell lung cancer // *Pathol. Oncol. Res.* – 2013. – V. 19, No 2. – P. 281–286. – doi: 10.1007/s12253-012-9580-2.
8. Singh M.K., Dadke D., Nicolas E., Serebriiskii I.G., Apostolou S., Canutescu A., Egleston B.L., Golemis E.A. A novel Cas family member, HEPL, regulates FAK and cell spreading // *Mol. Biol. Cell.* – 2008. – V. 19, No 4. – P. 1627–1636. – doi: 10.1091/mbc.E07-09-0953.
9. Miao Y., Wang L., Liu Y., Li A.-L., Liu Sh.-L., Cao H.-Y., Zhang X.-P., Jiang G.-Y., Liu D., Wang E.-H. Overexpression and cytoplasmic accumulation of Hepl is associated with clinicopathological parameters and poor prognosis in non-small cell lung cancer // *Tumour Biol.* – 2013. – V. 34, No 1. – P. 107–114. – doi: 10.1007/s13277-012-0517-x.
10. Mitsudomi T., Viallet J., Mulshine J.L., Linnoila R.I., Minna J.D., Gazdar A.F. Mutations of ras genes distinguish a subset of non-small-cell lung cancer cell lines from small-cell lung cancer cell lines // *Oncogene.* – 1991. – V. 6, No 8. – P. 1353–1362. – doi: 10.1016/0169-5002(92)90122-Z.

11. *Takahashi T., Nau M.M., Chiba I., Birrer M.J., Rosenberg R.K., Vinocour M., Levitt M., Pass H., Gazdar A.F., Minna J.D.* p53: A frequent target for genetic abnormalities in lung cancer // *Science*. – 1989. – V. 246, No 4929. – P. 491–494. – doi: 10.1126/science.2554494.
12. *Seo S., Asai T., Saito T., Suzuki T., Morishita Y., Nakamoto T., Ichikawa M., Yamamoto G., Kawazu M., Yamagata T., Sakai R., Mitani K., Ogawa S., Kurokawa M., Chiba Sh., Hirai H.* Crk-associated substrate lymphocyte type is required for lymphocyte trafficking and marginal zone B cell maintenance // *J. Immunol.* – 2005. – V. 175, No 6. – P. 3492–3501. – doi: 10.4049/jimmunol.175.6.3492.
13. *Deneka A., Kopp M., Nikonova A.S., Gaponova A.V., Nagele A., Hensley H., Golemis E.* Constitutive Nedd9 null genotype promotes lung cancer aggressiveness // *Cancer Res.* – 2017 – V. 77, No 13 Suppl. – Abstr. No 1834. – doi:10.1158/1538-7445.AM2017-1834.
14. *Jin Y., Li F., Zheng C., Wang Y., Fang Z., Guo C., Wang X., Liu H., Deng L., Li Ch., Wang H., Chen H., Feng Y., Ji H.* NEDD9 promotes lung cancer metastasis through epithelial-mesenchymal transition // *Int. J. Cancer.* – 2014. – V. 134, No 10. – P. 2294–2304. – doi: 10.1002/ijc.28568.
15. *Chang J.X., Gao F., Zhao G.Q., Zhang G.J.* Effects of lentivirus-mediated RNAi knock-down of NEDD9 on human lung adenocarcinoma cells in vitro and in vivo // *Oncol. Rep.* – 2014. – V. 32, No 4. – P. 1543–1549. – doi:10.3892/or.2014.3347.

Поступила в редакцию
26.04.2019

Топчу Юлия Алексеевна, младший научный сотрудник НИЛ «Молекулярные основы патогенеза и терапии опухолевых заболеваний»

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: topchu_1993@mail.ru

Мазитова Александра Маратовна, младший научный сотрудник НИЛ «Молекулярные основы патогенеза и терапии опухолевых заболеваний»

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: sashamazitova@mail.ru

Тихомирова Мария Владимировна, младший научный сотрудник НИЛ «Молекулярные основы патогенеза и терапии опухолевых заболеваний»

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: mary20011994@mail.ru

Абрамова Зинаида Ивановна, доктор биологических наук, главный научный сотрудник НИЛ «Молекулярные основы патогенеза и терапии опухолевых заболеваний»

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: ziabramova@mail.ru

Денека Александр Ярославович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник НИЛ «Молекулярные основы патогенеза и терапии опухолевых заболеваний»

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: AYDeneka@kpfu.ru

doi: 10.26907/2542-064X.2020.1.123-133

**Nedd9 Regulates Metastasis of Non-Small Cell Lung Cancer
through Activation of Epithelial-Mesenchymal Transition
and Tumor Cells Migration**Y.A. Topchu^{*}, A.M. Mazitova^{**}, M.V. Tikhomirova^{***},
Z.I. Abramova^{****}, A.Y. Deneka^{*****}

Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia

E-mail: ^{*}topchu_1993@mail.ru, ^{**}sashamazitova@mail.ru, ^{***}mary20011994@mail.ru,
^{****}ziabramova@mail.ru, ^{*****}AYDeneka@kpfu.ru

Received April 26, 2019

Abstract

Non-small cell lung cancer (NSCLC) has a low survival rate, with metastasis contributing to the vast majority of deaths. Elevated expression of the protein Nedd9 (neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9) has been reported in a large subset of lung cancers and other malignancies as a promotor of aggressive phenotypes and drug resistance. This study was performed to identify the mechanisms by which Nedd9 regulates invasion and metastasis of non-small cell lung cancer in the transgenic murine model.

Aiming to address the research goals, we performed a set of *in vivo* and *in vitro* experiments with the help of such methods as magnetic resonance imaging (MRI), immunohistochemical staining of tissues and microscopy, western blotting.

We found that *Nedd9* constitutive null genotype enhanced tumor growth in an inducible *Kras/Trp53* model, in which *Kras* mutation is induced specifically in the lung tissue by inhalation of adenovirus. Pathological examination of the tissues demonstrated that *Nedd9* null genotype also was associated with higher invasive capacity *in vivo*, including direct invasion to the heart. We carried out a set of experiments to unveil the mechanism underlying the phenotype discovered.

Overall, our data support the model in which Nedd9 provides critical support for early stages of the NSCLC growth, and progression beyond this early stage in the absence of Nedd9 requires extensive intracellular protein signaling reprogramming, allowing tumor cells to acquire mesenchymal properties, such as increased mobility and invasion due to a compensatory rearrangement of intracellular protein signaling pathways and activation of the epithelial-mesenchymal transition (EMT). These results are novel and have not been previously described in the literature.

The biological mechanism by which Nedd9 regulates growth, invasion, and metastasis of NSCLC has been poorly investigated, and its study carries not only fundamental implication – discovery of novel mechanisms driving tumor development, but also significant practical importance: assessment of levels of Nedd9 activity in NSCLC patients can potentially serve as a biomarker of response to chemotherapy.

Keywords: lung cancer, metastasis, epithelial to mesenchymal transition, immunohistochemistry, transgenic murine model

Acknowledgments. The research was funded by the Russian Science Foundation (project no. 18-75-00104). The part of this study was supported by Russian Government Program of Competitive Growth of Kazan Federal University.

Author contribution statement. Y.A. Topchu – conducting experiments, interpretation of the results, writing of the manuscript; A.M. Mazitova – conducting experiments, interpretation of the results, writing of the manuscript; M.V. Tikhomirova – conducting experiments, interpretation of the results; Z.I. Abramova – reviewing and editing of the manuscript; A.Y. Deneka – project development, conceptualization, original draft preparation.

Figure Captions

- Fig. 1. Comparative analysis of tumor burden in the lungs of mice with the intact *Nedd9* and null *Nedd9* (*Nedd9*^{-/-}) genotype. Representative MRI images (a) and quantitation of tumor volume (b) based on MRI scans of the lungs of mice aged 29 weeks. Arrows indicate tumors in the lungs.
- Fig. 2. Hematoxylin- and eosin-stained lung tissues from mice with intact *Nedd9* and null *Nedd9* (*Nedd9*^{-/-}) genotype. Arrow indicates direct invasion into the heart tissue.
- Fig. 3. Absence of *Nedd9* increases the metastatic activity of tumor cells through activation of epithelial-mesenchymal transition (EMT). a) Immunofluorescent immunohistochemical (IF-IHC) staining of tumor sections from mice with intact *Nedd9* and null *Nedd9* (*Nedd9*^{-/-}) genotype for mesenchymal marker vimentin (orange) and macrophage marker F4-80 (green) and DAPI (blue). b) Representative images from Western blot analysis for EMT marker vimentin in murine tumor tissue lysates (four mice with null *Nedd9* and four control mice).

References

1. Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. Cancer statistics, 2017. *Ca-Cancer J. Clin.*, 2017, vol. 67, no. 1, pp. 7–30. doi: 10.3322/caac.21387.
2. Greuber E.K., Smith-Pearson P., Wang J., Pendergast A.M. Role of ABL family kinases in cancer: From leukemia to solid tumors. *Nat. Rev. Cancer*, 2013, vol. 13, no. 8, pp. 559–571. doi: 10.1038/nrc3563.
3. Law S.F., Estojak J., Wang B., Mysliwiec T., Kruh G., Golemis E.A. Human enhancer of filamentation 1, a novel p130^{cas}-like docking protein, associates with focal adhesion kinase and induces pseudohyphal growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 1996, vol. 16, no 7, pp. 3327–3337. doi: 10.1128/MCB.16.7.3327.
4. Pugacheva E.N., Jablonski S.A., Hartman T.R., Henske E.P., Golemis E.A. HEF1-dependent Aurora A activation induces disassembly of the primary cilium. *Cell*, 2007, vol. 129, no. 7, pp. 1351–1363. doi: 10.1016/j.cell.2007.04.035.
5. Morimoto K., Tanaka T., Nitta Y., Ohnishi K., Kawashima H., Nakatani T. NEDD9 crucially regulates TGF-beta-triggered epithelial-mesenchymal transition and cell invasion in prostate cancer cells: Involvement in cancer progressiveness. *Prostate*, 2014, vol. 74, no. 8, pp. 901–910. doi: 10.1002/pros.22809.
6. Feng Y., Wang Y., Wang Z., Fang Z., Li F., Gao Y., Liu H., Xiao T., Li F., Zhou Y., Zhai Q., Liu X., Sun Y., Bardeesy N., Wong K.-kin., Chen H., Xiong Zh.-qi., Ji H. The CRTC1-NEDD9 signaling axis mediates lung cancer progression caused by LKB1 loss. *Cancer Res.*, 2012, vol. 72, no. 24, pp. 6502–6511. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1909.
7. Miao Y., Li A.-L., Wang L., Fan Ch.-F., Zhang X.-P., Xu H.-T., Yang L.-H., Liu Y., Wang E.-H. Overexpression of NEDD9 is associated with altered expression of E-Cadherin, β -Catenin and N-Cadherin and predictive of poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Pathol. Oncol. Res.*, 2013, vol. 19, no. 2, pp. 281–286. doi: 10.1007/s12253-012-9580-2.
8. Singh M.K., Dadke D., Nicolas E., Serebriiskii I.G., Apostolou S., Canutescu A., Egleston B.L., Golemis E.A. A novel Cas family member, HEPL, regulates FAK and cell spreading. *Mol. Biol. Cell*, 2008, vol. 19, no. 4, pp. 1627–1636. doi: 10.1091/mbc.E07-09-0953.
9. Miao Y., Wang L., Liu Y., Li A.-L., Liu Sh.-L., Cao H.-Y., Zhang X.-P., Jiang G.-Y., Liu D., Wang E.-H. Overexpression and cytoplasmic accumulation of Hepl is associated with clinicopathological parameters and poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Tumour Biol.*, 2013, vol. 34, no. 1, pp. 107–114. doi: 10.1007/s13277-012-0517-x.
10. Mitsudomi T., Viallet J., Mulshine J.L., Linnoila R.I., Minna J.D., Gazdar A.F. Mutations of ras genes distinguish a subset of non-small-cell lung cancer cell lines from small-cell lung cancer cell lines. *Oncogene*, 1991, vol. 6, no. 8, pp. 1353–1362. doi: 10.1016/0169-5002(92)90122-Z.
11. Takahashi T., Nau M.M., Chiba I., Birrer M.J., Rosenberg R.K., Vinocour M., Levitt M., Pass H., Gazdar A.F., Minna J.D. p53: A frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science*, 1989, vol. 246, no. 4929, pp. 491–494. doi: 10.1126/science.2554494.
12. Seo S., Asai T., Saito T., Suzuki T., Morishita Y., Nakamoto T., Ichikawa M., Yamamoto G., Kawazu M., Yamagata T., Sakai R., Mitani K., Ogawa S., Kurokawa M., Chiba Sh., Hirai H. Crk-

- associated substrate lymphocyte type is required for lymphocyte trafficking and marginal zone B cell maintenance. *J. Immunol.*, 2005, vol. 175, no. 6, pp. 3492–3501. doi: 10.4049/jimmunol.175.6.3492.
13. Deneka A., Kopp M., Nikonova A.S., Gaponova A.V., Nagele A., Hensley H., Golemis E. Constitutive Nedd9 null genotype promotes lung cancer aggressiveness. *Cancer Res.*, 2017, vol. 77, no. 13, suppl., abstr. 1834. doi: 10.1158/1538-7445.AM2017-1834.
 14. Jin Y., Li F., Zheng C., Wang Y., Fang Z., Guo C., Wang X., Liu H., Deng L., Li Ch., Wang H., Chen H., Feng Y., Ji H. NEDD9 promotes lung cancer metastasis through epithelial-mesenchymal transition. *Int. J. Cancer*, 2014, vol. 134, no. 10, pp. 2294–2304. doi: 10.1002/ijc.28568.
 15. Chang J.X., Gao F., Zhao G.Q., Zhang G.J. Effects of lentivirus-mediated RNAi knockdown of NEDD9 on human lung adenocarcinoma cells in vitro and in vivo. *Oncol. Rep.*, 2014, vol. 32, no. 4, pp. 1543–1549. doi: 10.3892/or.2014.3347.

Для цитирования: Топчу Ю.А., Мазитова А.М., Тихомирова М.В., Абрамова З.И., Денека А.А. NEDD9 регулирует метастазирование немелкоклеточного рака легкого за счет активации эпителиально-мезенхимального перехода и миграционной способности опухолевых клеток // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2020. – Т. 162, кн. 1. – С. 123–133. – doi: 10.26907/2542-064X.2020.1.123-133.

For citation: Topchu Y.A., Mazitova A.M., Tikhomirova M.V., Abramova Z.I., Deneka A.Y. Nedd9 regulates metastasis of non-small cell lung cancer through activation of epithelial-mesenchymal transition and tumor cells migration. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2020, vol. 162, no. 1, pp. 123–133. doi: 10.26907/2542-064X.2020.1.123-133. (In Russian)