

DOI: 10.21294/1814-4861-2022-21-4-47-55
УДК: 616.24-006.6:577.112

Для цитирования: Тихомирова М.В., Бармин В.В., Топчу Ю.А., Мазитова А.М., Ратнер Е.Ю., Сабиров А.Г., Абрамова З.И., Денека А.Я. Экспрессия поддерживающего белка NEDD9 как негативный прогностический маркер при немелкоклеточном раке легкого (НМРЛ). Сибирский онкологический журнал. 2022; 21(4): 47–55. – doi: 10.21294/1814-4861-2022-21-4-47-55

For citation: Tikhomirova M.V., Barmin V.V., Topchu Yu.A., Mazitova A.M., Ratner E. Yu., Sabirov A.G., Abramova Z.I., Deneka A. Ya. NEDD9 scaffolding protein expression as a negative prediction marker in non-small cell lung cancer (NSCLC). Siberian Journal of Oncology. 2022; 21(4): 47–55. – doi: 10.21294/1814-4861-2022-21-4-47-55

ЭКСПРЕССИЯ ПОДДЕРЖИВАЮЩЕГО БЕЛКА NEDD9 КАК НЕГАТИВНЫЙ ПРОГНОСТИЧЕСКИЙ МАРКЕР ПРИ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ЛЕГКОГО (НМРЛ)

М.В. Тихомирова¹, В.В. Бармин², Ю.А. Топчу¹, А.М. Мазитова¹, Е.Ю. Ратнер³,
А.Г. Сабиров³, З.И. Абрамова¹, А.Я. Денека¹

ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань, Россия¹
Россия, 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18. E-mail: denekaalex@gmail.com¹

Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ
«Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России,
г. Москва, Россия²

Россия, 125284, г. Москва, 2-й Боткинский пр., 3²

ГАУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер Минздрава Республики Татарстан
им. проф. М.З. Сигала, г. Казань, Россия³

Россия, 420029, г. Казань, ул. Сибирский тракт, 29³

Аннотация

Цель исследования. Оценка прогностической значимости поддерживающего белка NEDD9 у пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ). NEDD9 (Neural precursor cell Expressed, Developmentally Down-regulated 9) является поддерживающим белком во множестве внутриклеточных белковых каскадов, таких как PI3K-AKT-mTOR, Ras-ERK, играющих ключевые роли при прогрессировании опухолей. В литературе охарактеризована регуляторная роль NEDD9 во множестве солидных опухолей, в т. ч. и НМРЛ, однако детального анализа с целью оценки значимости NEDD9 как предиктивного маркера прогрессирования немелкоклеточного рака легкого ранее проведено не было. **Материал и методы.** Проведены Log-rank анализ (тест логарифмического ранга) между клинико-патологическими параметрами когорты пациентов с НМРЛ (n=16) и ИГХ-экспрессии NEDD9, оцененной с помощью метода количественной оценки h-score, в гистологических образцах пациентов, а также корреляционное исследование между показателями течения заболевания, такими как общая (ОВ) и беспрогрессивная выживаемость (БПВ), и экспрессией NEDD9. Полученные данные были валидированы в более обширной когорте данных РНК-секвенирования TCGA (n=566). **Результаты.** Показана достоверная разница (p<0,05) между экспрессией NEDD9 на третьей стадии заболевания в сравнении со второй и четвертой. Уровень экспрессии был аппроксимирован на высокий и низкий (по усредненному значению h-score=56.14) и был обнаружен положительный корреляционный тренд между сниженной экспрессией NEDD9 и снижением общей (ОВ) и беспрогрессивной выживаемостью (БПВ) пациентов. Анализ когорты пациентов из TCGA позволил обнаружить статистически достоверную положительную зависимость между экспрессией NEDD9 и ОВ (p=0,05). **Заключение.** Экспрессия поддерживающего белка NEDD9 как на белковом, так и РНК уровне положительно коррелирует с негативным прогнозом при НМРЛ. Для более детального понимания роли NEDD9 в развитии и метастазировании НМРЛ необходимы фундаментальные и клинические исследования с использованием более обширных когорт пациентов.

Ключевые слова: немелкоклеточный рак легкого, общая выживаемость, беспрогрессивная выживаемость, поддерживающие белки, NEDD9, маркеры-предикторы.

NEDD9 SCAFFOLDING PROTEIN EXPRESSION AS A NEGATIVE PREDICTION MARKER IN NON-SMALL CELL LUNG CANCER (NSCLC)

**M.V. Tikhomirova¹, V.V. Barmin², Yu.A. Topchu¹, A.M. Mazitova¹,
E.Yu. Ratner³, A.G. Sabirov³, Z.I. Abramova¹, A.Ya. Deneka¹**

Kazan (Privolzhsky) Federal University, Kazan, Russia¹
18, Kremlyevskaya Street, 420008, Kazan, Russia. E-mail: denekaalex@gmail.com¹
P.A. Hertsen Moscow Oncology Research Institute – Branch of the National Medical
Research Radiological Center of the Ministry of Health of the Russia, Moscow, Russia²
3, 2-nd Botkinsky proezd, 25284, Moscow, Russia²
M. Sigal Republic Clinical Cancer Center, Kazan, Russia³
29, Sibirskiy Trakt, 420029, Kazan, Russia³

Abstract

The purpose of the study was to assess the prognostic significance of a scaffolding NEDD9 protein in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). NEDD9 (Neural Precursor Cell Expressed, Developmentally Down-regulated 9) is a scaffolding protein in many intracellular protein cascades, such as PI3K-AKT-mTOR, Ras-ERK, which play key roles in tumor progression. Several studies define the regulatory role of NEDD9 in progression of several solid cancers, including non-small cell lung cancer (NSCLC), however its role as a prediction biomarker is minimally assessed. **Materials and Methods.** In the current study quantitative immunohistochemical (IHC) approach was utilized to characterize NEDD9 expression in a cohort of NSCLC primary tumor samples (n=16), and correlative statistical analysis was performed between NEDD9 expression and a set of patients' clinical and pathological characteristics. Results of the IHC analysis were validated using broader TCGA RNAseq dataset (n=566). **Results.** The study demonstrated significant difference between the expression of NEDD9 in stage III tumors versus stages II and IV (p<0.05). Next, NEDD9 expression level was approximated to high and low (based on median h-score=56.14) and statistical survival analysis revealed a positive correlative trend between the decreased expression of NEDD9 and the decrease in the overall (OS) and progression-free survival (PFS) of the patients. Analysis of TCGA dataset harboring RNA seq data confirmed statistically significant correlation (p=0.05) between low NEDD9 expression and decreased OS. **Conclusion.** This study suggests that the expression of the scaffolding protein NEDD9, both at the protein and RNA levels, positively correlates with a negative prognosis in NSCLC, suggesting that it can potentially be used as a novel biomarker of disease progression. Further basic and clinical research defining the role of NEDD9 in the progression and metastasis of NSCLC are strongly warranted.

Key words: Non-small cell lung cancer, overall survival, scaffolding proteins, NEDD9, prediction markers.

Введение

В настоящее время смертность от немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) занимает лидирующее место среди всех онкологических заболеваний [1]. Несмотря на то, что в последнее время увеличивается количество пациентов, для которых заболевание выявляется на ранних стадиях, большинство больных обращаются за лечением с распространенным НМРЛ, когда прогноз становится неблагоприятным, особенно при наличии рефрактерного к лечению метастатического поражения [2]. Поэтому важную роль для совершенствования методов лечения НМРЛ играют не только разработка новых препаратов и терапевтических подходов, более эффективных на поздних стадиях, но также улучшение адъювантной терапии, а также поиск новых прогностических биомаркеров НМРЛ.

Одним из новых и потенциально значимых биомаркеров является NEDD9. Этот белок является поддерживающим медиатором в множестве

внутриклеточных сигнальных каскадов, таких как PI3K-AKT-mTOR, Ras-ERK, и интегринов, играющих ключевые роли в росте и прогрессировании множества опухолей, в т. ч. и НМРЛ [3–6], а также активатором тирозинкиназ семейства SRC, повышенная экспрессия которых ассоциируется с процессами эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) – одного из ключевых биологических механизмов, лежащих в основе метастазирования НМРЛ [7–10]. В литературе показано, что повышенная экспрессия NEDD9 в опухолевых клетках ассоциируется с увеличением метастатического потенциала за счет приобретения клетками более мезенхимального фенотипа и увеличения миграционной способности клеток [11–14]. Важно отметить данные о том, что изменение уровней экспрессии NEDD9 в солидных опухолях ассоциируется с метастазированием и сниженной выживаемостью пациентов [15, 16], однако этот вопрос в контексте НМРЛ изучен недостаточно

досконально: детального анализа корреляции экспрессии NEDD9 с клиническими показателями выживаемости и прогрессированием заболевания проведено не было.

Целью исследования явилась оценка прогностической значимости белка NEDD9 у пациентов с НМРЛ.

Материал и методы

В данном ретроспективном исследовании нами были изучены образцы первичных опухолей от 16 пациентов с НМРЛ, фиксированные в парафине, полученные из базы данных образцов пациентов, проходивших лечение в Республиканском клиническом онкологическом диспансере (РКОД) г. Казань, Республики Татарстан. Исследование одобрено этическим комитетом РКОД и Казанского федерального университета, протокол № 8 от 13.02.18. У каждого пациента на момент проведения забора материала с целью гистологической верификации, а также перед хирургическим лечением было взято письменное согласие на последующую анонимизированную обработку. Все образцы были анонимизированы, аннотированы.

Ткани первичной опухоли легкого были зафиксированы формальдегидом и погружены в парафин. Парафиновый блок, содержащий образцы тканей, нарезают, толщиной 3–5 мкм и фиксируют их на предметном стекле. ИГХ-окрашивание выполняли по следующей методике: срезы с целью депарафинизации трижды погружали в 100 % ксилен на 5 мин. Затем срезы дегидратировались в серии растворов этанола (100, 70, 50 %) при погружении на 3 мин в каждый. Затем проводилась термическая демаскировка эпитопов в 0,01M цитратном буфере (pH 6.0). ИХГ окрашивание производилось с использованием первичных антител к NEDD9 в концентрации 5 мкг/мл (2G9, Abcam, Бостон, США) и набора вторичных антител против мыши HRP/DAV IHC Detection kit–Micro-polymer (Abcam ab236466, Бостон, США). В качестве негативного контроля окрашивания вместо первичного антитела к NEDD9 использовалось мышиное IgG антитело. После ИГХ-окрашивания производилось дополнительное окрашивание гематоксилином. В конце срезы были повторно дегидратированы с помощью погружения в серию растворов этанола (70, 96, 100 %) и ксилена на 3 мин в каждый. Покрытые стекла фиксировались с помощью раствора Histomount (HS-103, National Diagnostics, Атланта, США).

Окрашенные препараты сканировались на рабочей станции Leica Aperio CS2 (Leica Biosystems, Сан-Диего, США). Оценку ИГХ-экспрессии NEDD9 проводили с использованием полуколичественного метода h-score в программном обеспечении QPath (QuPath: <https://qupath.github.io/>) [17], при котором уровень экспрессии определяется по формуле

$$[1 \times (\% \text{ клеток } 1+) + 2 \times (\% \text{ клеток } 2+) + 3 \times (\% \text{ клеток } 3+)]$$

и варьируется от 0 до 300 баллов [18].

Для корреляционного анализа РНК экспрессии NEDD9 и клинико-прогностических показателей пациентов с НМРЛ использовались материалы общедоступных баз данных Атласа геномных данных опухолей (TCGA) пациентов с аденокарциномой легкого, находящиеся на портале <http://www.cbioportal.org> (ноябрь 2021). Использовался доступный онлайн набор инструментов визуализации и обработки данных [19].

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8.0 (Сан-Диего, США), а также инструментов статистического анализа, доступных на сайте <http://www.cbioportal.org>. Для сравнения количественного показателя h-score на разных стадиях НМРЛ использовался непараметрический тест Манна–Уитни. Корреляция клинико-патологических показателей и экспрессии NEDD9 была оценена методом log-rank test. Кривые выживаемости были построены с использованием метода Каплана–Мейера для оценки БПВ и ОВ.

Результаты

В исследовании анализировалась когорта из 16 пациентов, из них 69 % мужчин, 31 % женщин (табл. 1). Медиана возраста – 57 лет, средний возраст – 57,3 года, стандартное отклонение – 7,4 года; диапазон от 38 до 68 лет. Четырем (25 %) пациентам был поставлен диагноз НМРЛ II стадии, 6 и 6 пациентам – НМРЛ III и IV стадии (по 37,5 % соответственно). Больным проведено лечение в соответствии с текущими клиническими рекомендациями; ни один из пациентов не участвовал в клинических исследованиях. Химио- и таргетная терапия проводилась в адъювантном режиме. Образцы опухолевой ткани были получены перед началом лечения. Пациентам с IV стадией НМРЛ была выполнена расширенная лобэктомия или пневмонэктомия с паллиативной целью. Данных за ассоциацию между клинико-патологическими характеристиками, такими как возраст, пол, стадия заболевания, и общей (ОВ) или бесспрогрессивной (БПВ) выживаемостью не обнаружено ($p > 0,05$) (табл. 2).

На первом этапе исследования нами была проведена оценка уровней экспрессии белка NEDD9 с использованием метода ИГХ окрашивания и анализа h-score. Обнаружено, что при НМРЛ III стадии отмечается значимое снижение уровня белка NEDD9 по сравнению с НМРЛ II стадии (усредненный h-score 31,5 против 52,1; $p = 0,04$), с дальнейшим повышением при НМРЛ IV стадии (усредненный h-score 31,5 против 76,05; $p = 0,006$) (рис. 1А, Б). Для подтверждения полученных данных в более широкой выборке была произведена оценка экспрессии РНК NEDD9 в базе данных

Таблица 1/ Table 1

Клиническая характеристика исследуемой когорты больных НМРЛ
Clinical characteristics of the cohort of NSCLC patients

Показатель/Parameter	
Пол/Gender	
Мужской/Males	69 %
Женский/Females	31 %
Возраст на момент постановки диагноза, лет / Age at diagnosis, years	
Средний/Medium	57,3
Мин/Min	38
Макс/Max	68
Ст. отклонения/Standard deviation	7,4
Гистологический тип опухоли/Histological type of tumor	
Аденокарцинома/Adenocarcinoma	43,8 %
Плоскоклеточный рак/ Squamous cell carcinoma	31,1 %
Папиллярная аденокарцинома/ Papillary adenocarcinoma/	6,3 %
Аденосквамозная карцинома/ Adenosquamous carcinoma	12,5%
Бронхиоло-альвеолярный рак/ Bronchioalveolar carcinoma	6,3 %
Стадия/Stage	
IIA	12,5 %
IIIB	12,5 %
IIIA	31,3 %
IIIB	6,3 %
IVA	12,5 %
IVB	24,9 %
T стадия/Stage T	
x	6 %
2	81 %
4	13 %
N стадия/Stage N	
0	13 %
1	44 %
2	25 %
3	6 %
x	13 %
M стадия/Stage M	
0	81 %
1	19 %
Курение/Smoking	
Курильщик/Smoker	63 %
Не курил(а)/Non-smoker	37 %
Лечение на стадиях I–III/Treatment for stages I–III	
Химиотерапия/Chemotherapy	10 %
Хирургическое лечение/Surgery	90 %
Лечение на IV стадии/Treatment for stage IV	
Таргетная и химиотерапия/ Targeted therapy and chemotherapy	16,6 %
Химиотерапия/Chemotherapy	50 %
Хирургическое лечение/Surgery	33,4 %

пациентов TCGA_PanCancer (n=566). Вариабельности экспрессии NEDD9, сходной с таковой, обнаруженной ранее, подтверждено не было (рис. 1 B), однако отмечался тренд к повышению экспрессии NEDD9 при НМРЛ IV стадии.

Для оценки прогностической значимости экспрессии NEDD9 нами проведен корреляционный анализ между уровнями экспрессии NEDD9 (как белка, так и РНК) и общей выживаемостью (ОВ), а также беспрогрессивной выживаемостью (БПВ) пациентов с НМРЛ. На первом этапе анализ проводился в когорте образцов РКОД. Значимой корреляции между экспрессией NEDD9 (дихотомическое распределение по усредненному значению h-score=56,14) и ОВ и БПВ у пациентов на стадиях заболевания не обнаружено (ОВ – p=0,31; БПВ – p=0,33; рис. 2А, Б), однако отмечался тренд между низким уровнем экспрессии NEDD9 и снижением показателей ОВ и БПВ.

Поскольку одним из ограничений данного исследования является небольшой размер выборки, для верификации полученных данных на следующем этапе был проведен аналогичный анализ с использованием более обширной когорты TCGA_PanCancer. Обнаружено, что снижение экспрессии РНК NEDD9 (нижний квартиль диапазона экспрессии) в первичных опухолях НМРЛ значимо коррелирует со снижением ОВ (p=0,05; рис. 2 B), но не с БПВ (p=0,45; рис. 2Г), по сравнению с повышенной (верхний квартиль) экспрессией NEDD9.

Обсуждение

Совершенствование методов хирургического лечения и системной терапии не всегда приводит к существенному улучшению отдаленных результатов, но внедрение таргетной терапии в адьювантном режиме позволяет значительно снизить частоту рецидивов и отдаленных метастазов (исследование ADAURA) [20]. Поэтому поиск новых предиктивных биомаркеров, позволяющих оценить риски прогрессирования НМРЛ, является чрезвычайно актуальным [21, 22].

В данном исследовании обнаружено, что при НМРЛ III стадии отмечается значимое снижение экспрессии белка NEDD9. Однако по данным анализа выживаемости, проведенного с использованием расширенной выборки пациентов (566 образцов), именно сниженная экспрессия РНК NEDD9 являлась негативным прогностическим фактором в отношении общей выживаемости пациентов. Поскольку экспрессия белков, участвующих во внутриклеточных сигнальных каскадах, связанная с пролиферативной и миграционной активностью опухолевых клеток, в которых NEDD9 играет важную роль, в значительной степени регулируется посттрансляционно [23], на основании полученных данных сделан вывод о том, что стабильная экспрессия РНК NEDD9 не всегда коррелирует с уровнями белка в клетках. Это позволяет, с одной

Таблица 2/ Table 2

Log-rank анализ между клиничко-патологическими параметрами пациентов НМРЛ с общей и беспрогрессивной выживаемостью

Log-rank analysis of clinicopathological parameters of the NSCLC patient with overall or progression-free survival

Показатель/Parameter		Общая выживаемость, мес, ДИ 95 %/ Overall survival, months, 95 % CI			Беспрогрессивная выживаемость, мес, ДИ 95 %/ Progression-free survival, months, 95 % CI		
		Log-rank	p-value		Log-rank	p-value	
Возраст, лет/ Age (years)							
< медиана/ median	7 (43,7 %)	16,0 (13,8–18,2)	0,64	0,43	7,0 (6,0–8,0)	2,13	0,14
> медиана / median	9 (56,3 %)	22,0 (13,2–30,8)			9,0 (8,1–9,9)		
Ст. откл./ Standard deviation	7,4						
Пол/ Sex							
Муж/ Male	11 (69 %)	15,0 (6,4–23,6)	0,05	0,82	7,0 (3,9–10,1)	0,53	0,47
Жен/ Female	5 (31 %)	18,0 (15,8–20,2)			8,0 (6,3–9,7)		
Стадия/ Stage							
II	4 (25 %)	19,0 (13,9–24,1)	3,62	0,16	9,0 (7,8–10,2)	1,04	0,6
III	6 (37,5 %)	19,0 (15,3–22,7)			7,0 (5,2–8,8)		
IV	6 (37,5 %)	12,0 (3,3–20,7)			4,0 (2,5–5,5)		
Всего/ Total	16 (100 %)						

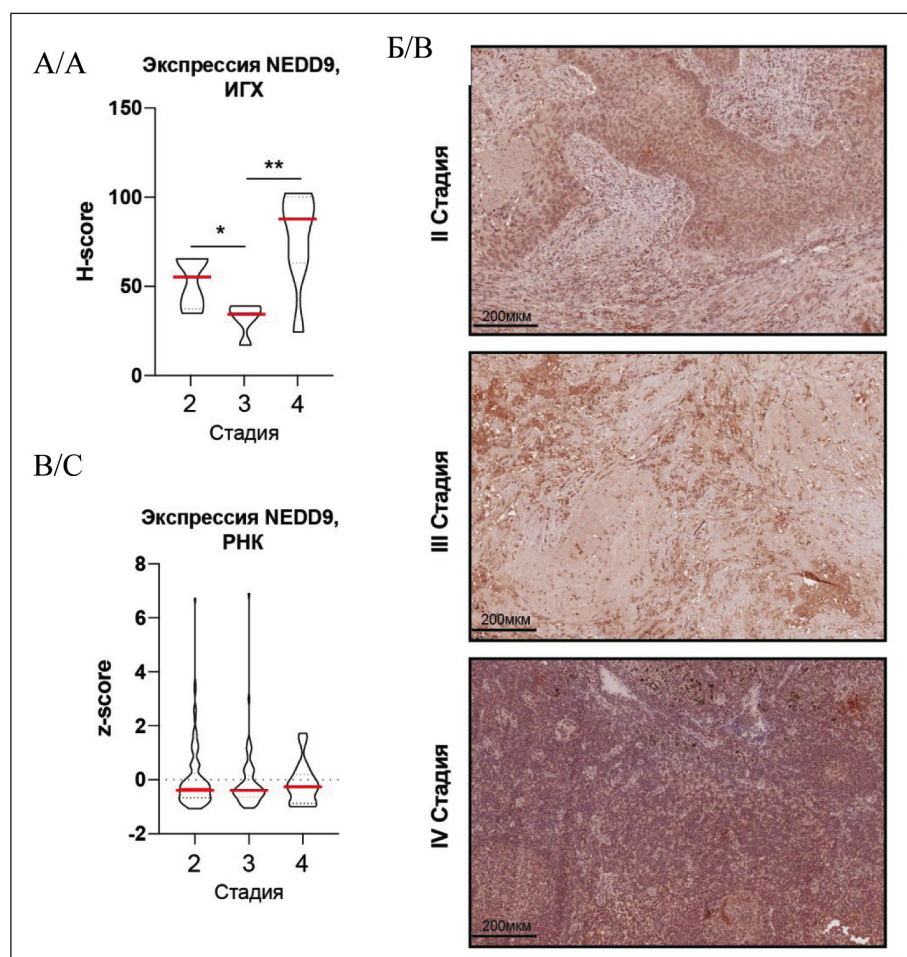


Рис. 1. Разделение уровней экспрессии NEDD9 у больных НМРЛ разных стадий: А) уровни белка NEDD9 в образцах когорты РКОД, установленные с помощью анализа h-score данных ИГХ, а также репрезентативные микрофотографии (Б); В) уровни мРНК NEDD9 (относительные z-score), установленные по данным анализа РНК-секвенирования доступных в базе данных TCGA-PanCan на <http://www.cbioportal.org>. На графиках: * – p<0,05; ** – p<0,01. Шкала: 200 мкм

Fig. 1. Segregation of NEDD9 expression levels of patients with NSCLC at different stages of the disease: А) NEDD9 protein levels in samples from the RCOD cohort as determined by h-score analysis of IHC data, and representative photomicrographs (Б); С) NEDD9 mRNA levels (relative z-score) determined from TCGA-PanCan RNAseq dataset available at <http://www.cbioportal.org>. All graphs: * – p<0.05; ** – p<0.01. Scale: 200 μm

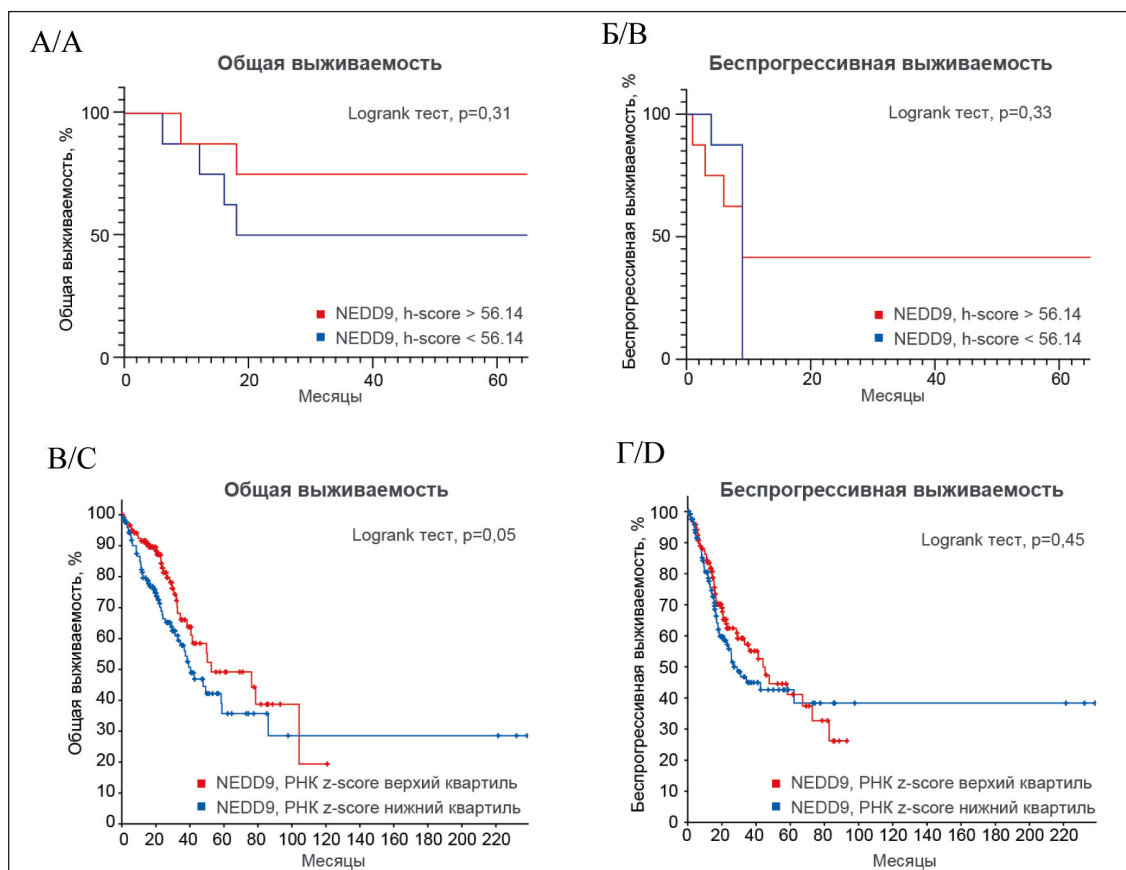


Рис. 2. Корреляция экспрессии NEDD9 в исследуемых когортах НМРЛ с ОБ и БПВ. Кривые общей (ОБ) и беспрогрессивной (БПВ) выживаемости по методу Каплана–Мейера на основе данных h-score экспрессии белка NEDD9 в образцах когорты РКОД (А, Б) и значений z-score мРНК NEDD9, доступных в базе данных TCGA-PanCan на <http://www.cbioportal.org> (В, Г)
 Fig. 2. Correlation of NEDD9 expression with OS and PFS in the NSCLC cohorts. Overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) curves plotted using the Kaplan–Meier method, based on h-score data of NEDD9 protein expression in RCO cohort samples (A, B) and NEDD9 mRNA z-score data available in the TCGA-PanCan dataset at <http://www.cbioportal.org> (C, D)

стороны, объяснить различия между экспрессией белка (оцененной с помощью ИГХ) и РНК (РНК-секвенирование) NEDD9 на различных стадиях. С другой стороны, эта разница может указывать на то, что на разных этапах прогрессирования НМРЛ в опухолевых клетках активируются биологические механизмы, зависящие поэтапно от уровней РНК и белка NEDD9.

Полученные нами данные, а также анализ литературы позволяют потенциально номинировать NEDD9 в качестве нового прогностического маркера течения заболевания у пациентов с НМРЛ II–III стадий. Одним из достоинств данного исследования является то, что для оценки экспрессии NEDD9 использован метод ИГХ, рутинно применяющийся в клинической практике, в отличие от РНК-секвенирования, которое пока не получило широкого распространения. Достоинствами последнего являются возможность аннотирования профилей экспрессии большой панели генов, обнаружение новых сигнатур экспрессии, специфичных для отдельных групп клеток, однако, учитывая наличие опухолевой гетерогенности, метод ИГХ

позволяет провести качественную оценку большей опухолевой поверхности и может служить дополнительным верификационным критерием результатов РНК-секвенирования [24]. Несмотря на ограниченный размер выборки образцов ИГХ, нами был обнаружен тренд к снижению выживаемости пациентов со сниженным уровнем экспрессии белка NEDD9, что, несомненно, указывает на необходимость проведения последующих ИГХ-исследований с использованием расширенных когорт образцов.

Заключение

На основании результатов исследования можно сделать вывод о том, что измерение уровня экспрессии поддерживающего белка NEDD9 у пациентов с НМРЛ может быть использовано в качестве нового прогностического маркера течения заболевания на ранних стадиях. Дальнейшее исследование значимости этого белка с использованием более широкой экспериментальной выборки представляют значительный интерес.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin.* 2019; 69(1): 7–34. doi: 10.3322/caac.21551.
2. SEER Cancer Statistics Review, 1975–2016. National Cancer Institute. Bethesda, MD.
3. Law S.F., Estojak J., Wang B., Mysliwiec T., Kruh G., Golemis E.A. Human enhancer of filamentation 1, a novel p130cas-like docking protein, associates with focal adhesion kinase and induces pseudohyphal growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 1996; 16(7): 3327–37. doi: 10.1128/MCB.16.7.3327.
4. Minegishi M., Tachibana K., Sato T., Iwata S., Nojima Y., Morimoto C. Structure and function of Cas-L, a 105-kD Crk-associated substrate-related protein that is involved in beta 1 integrin-mediated signaling in lymphocytes. *J Exp Med.* 1996; 184(4): 1365–75. doi: 10.1084/jem.184.4.1365.
5. van Seventer G.A., Salmen H.J., Law S.F., O'Neill G.M., Mullen M.M., Franz A.M., Kanner S.B., Golemis E.A., van Seventer J.M. Focal adhesion kinase regulates beta1 integrin-dependent T cell migration through an HGF1 effector pathway. *Eur J Immunol.* 2001; 31(5): 1417–27. doi: 10.1002/1521-4141(200105)31:5<1417::AID-IMMU1417>3.0.CO;2-C.
6. Bui L.C., Tomkiewicz C., Chevallier A., Pierre S., Bats A.S., Mota S., Raingeaud J., Pierre J., Diry M., Transy C., Garlatti M., Barouki R., Coumoul X. Nedd9/Hef1/Cas-L mediates the effects of environmental pollutants on cell migration and plasticity. *Oncogene.* 2009; 28(41): 3642–51. doi: 10.1038/onc.2009.224.
7. Kim L.C., Song L., Haura E.B. Src kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2009; 6(10): 587–95. doi: 10.1038/nrclinonc.2009.129.
8. Ombrato L., Malanchi I. The EMT universe: space between cancer cell dissemination and metastasis initiation. *Crit Rev Oncog.* 2014; 19(5): 349–61. doi: 10.1615/critrevoncog.2014011802.
9. Singh A., Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene.* 2010; 29(34): 4741–51. doi: 10.1038/onc.2010.215.
10. Smith B.N., Bhowmick N.A. Role of EMT in Metastasis and Therapy Resistance. *J Clin Med.* 2016; 5(2):17. doi: 10.3390/jcm5020017.
11. Morimoto K., Tanaka T., Nitta Y., Ohnishi K., Kawashima H., Nakatani T. NEDD9 crucially regulates TGF- β -triggered epithelial-mesenchymal transition and cell invasion in prostate cancer cells: involvement in cancer aggressiveness. *Prostate.* 2014; 74(8): 901–10. doi: 10.1002/pros.22809.
12. Feng J., Zhao J., Xie H., Yin Y., Luo G., Zhang J., Feng Y., Li Z. Involvement of NEDD9 in the invasion and migration of gastric cancer. *Tumour Biol.* 2015; 36(5): 3621–8. doi: 10.1007/s13277-014-2999-1.
13. Miao Y., Li A.L., Wang L., Fan C.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; 19(2): 281–6. doi: 10.1007/s12253-012-9580-2.
14. 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 Estestvennyye Nauki.* 2020. 162(1): 123–33.
15. Deneka A.Y., Kopp M.C., Nikonova A.S., Gaponova A.V., Kiseleva A.A., Hensley H.H., Flieder D.B., Serebriiskii I.G., Golemis E.A. Nedd9 Restrains Autophagy to Limit Growth of Early Stage Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res.* 2021; 81(13): 3717–26. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-20-3626.
16. Shagisultanova E., Gaponova A.V., Gabbasov R., Nicolas E., Golemis E.A. Preclinical and clinical studies of the NEDD9 scaffold protein in cancer and other diseases. *Gene.* 2015; 567(1): 1–11. doi: 10.1016/j.gene.2015.04.086.
17. Bankhead P., Loughrey M.B., Fernández J.A., Dombrowski Y., McArt D.G., Dunne P.D., McQuaid S., Gray R.T., Murray L.J., Coleman H.G., James J.A., Salto-Tellez M., Hamilton P.W. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep.* 2017; 7(1): 16878. doi: 10.1038/s41598-017-17204-5.
18. Hirsch F.R., Varela-García M., Bunn P.A. Jr., Di Maria M.V., Veve R., Bremmes R.M., Barón A.E., Zeng C., Franklin W.A. Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J Clin Oncol.* 2003; 21(20): 3798–807. doi: 10.1200/JCO.2003.11.069.
19. Gao J., Aksoy B.A., Dogrusoz U., Dresdner G., Gross B., Sumer S.O., Sun Y., Jacobsen A., Sinha R., Larsson E., Cerami E., Sander C., Schultz N. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal.* 2013; 6(269). doi: 10.1126/scisignal.2004088.
20. Wu Y.L., John T., Grohe C., Majem M., Goldman J.W., Kim S.W., Kato T., Laktionov K., Vu H.V., Wang Z., Lu S., Lee K.Y., Akewanlop C., Yu C.J., de Marinis F., Bonanno L., Domine M., Shepherd F.A., Zeng L., Atasoy A., Herbst R.S., Tsuboi M. Postoperative Chemotherapy Use and Outcomes From ADAURA: Osimertinib as Adjuvant Therapy for Resected EGFR-Mutated NSCLC. *J Thorac Oncol.* 2022; 17(3): 423–33. doi: 10.1016/j.jtho.2021.10.014.
21. Tian Y., Xu J., Chu Q., Duan J., Zhang J., Bai H., Yang Z., Fang W., Cai L., Wan R., Fei K., He J., Gao S., Zhang L., Wang Z., Wang J. A novel tumor mutational burden estimation model as a predictive and prognostic biomarker in NSCLC patients. *BMC Med.* 2020; 18(1): 232. doi: 10.1186/s12916-020-01694-8.
22. Camidge D.R., Doebele R.C., Kerr K.M. Comparing and contrasting predictive biomarkers for immunotherapy and targeted therapy of NSCLC. *Nat Rev Clin Oncol.* 2019; 16(6): 341–55. doi: 10.1038/s41571-019-0173-9.
23. Kudinov A.E., Karanicolas J., Golemis E.A., Bumber Y. Musashi RNA-Binding Proteins as Cancer Drivers and Novel Therapeutic Targets. *Clin Cancer Res.* 2017; 23(9): 2143–53. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-2728.
24. Byron S.A., Van Keuren-Jensen K.R., Engelthaler D.M., Carpten J.D., Craig D.W. Translating RNA sequencing into clinical diagnostics: opportunities and challenges. *Nat Rev Genet.* 2016; 17(5): 257–71. doi: 10.1038/nrg.2016.10.

Поступила/Received 23.04.2022

Одобрена после рецензирования/Revised 27.06.2022

Принята к публикации/Accepted 19.07.2022

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Тихомирова Мария Владимировна, младший научный сотрудник НИЛ «Молекулярные основы патогенеза и терапии опухолевых заболеваний», ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» (г. Казань, Россия). SPIN-код: 4208-9021. Researcher ID (WOS): AAF-8922-2019. Author ID (Scopus): 57218905317. ORCID: 0000-0001-9357-3649.

Бармин Виталий Валерьевич, кандидат медицинских наук, врач-торакальный хирург, Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России (г. Москва, Россия). SPIN-код: 2010-5336. Researcher ID (WOS): ABF-2617-2020. Author ID (Scopus): 55460197600.

Топчу Юлия Алексеевна, младший научный сотрудник НИЛ «Молекулярные основы патогенеза и терапии опухолевых заболеваний», ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» (г. Казань, Россия). SPIN-код: 5669-3336. Researcher ID (WOS): M-5368-2014. Author ID (Scopus): 57221785324. ORCID: 0000-0001-9105-5207.

Мазитова Александра Маратовна, младший научный сотрудник НИЛ «Молекулярные основы патогенеза и терапии опухолевых заболеваний», ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» (г. Казань, Россия). SPIN-код: 1746-3371. Researcher ID (WOS): B-8410-2019. Author ID (Scopus): 57003759900. ORCID: 0000-0002-9523-0698.

Рагнер Екатерина Юрьевна, врач-онколог отделения химиотерапии №1, ГАУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер Минздрава Республики Татарстан им. проф. М.З. Сигала (г. Казань, Россия). SPIN-код: 3593-9228. Author ID (Scopus): 57221997470.

Сабиров Алексей Германович, кандидат медицинских наук, заведующий патологоанатомическим отделением, ГАУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер Минздрава Республики Татарстан им. проф. М.З. Сигала (г. Казань, Россия). Author ID (Scopus): 57219981849.

Абрамова Зинаида Ивановна, доктор биологических наук, главный научный сотрудник НИЛ «Молекулярные основы патогенеза и терапии опухолевых заболеваний», ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» (г. Казань, Россия). SPIN-код: 5293-9741. Researcher ID (WOS): N-6976-2013. Author ID (Scopus): 24833015100. ORCID: 0000-0003-3749-3411.

Денека Александр Ярославович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник НИЛ «Молекулярные основы патогенеза и терапии опухолевых заболеваний», ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» (г. Казань, Россия). E-mail: denekaalex@gmail.com. SPIN-код: 6142-1215. Researcher ID (WOS): Q-7273-2017. Author ID (Scopus): 56703288700. ORCID: 0000-0003-2448-5156.

ВКЛАД АВТОРОВ

Тихомирова Мария Владимировна: подбор материалов исследования, экспериментальная работа, статистическая обработка, составление черновика рукописи.

Бармин Виталий Валерьевич: анализ научной работы, критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания, редактирование черновика рукописи.

Топчу Юлия Алексеевна: подбор материалов исследования, экспериментальная работа, статистическая обработка, составление черновика рукописи.

Мазитова Александра Маратовна: подбор материалов исследования, экспериментальная работа, статистическая обработка, составление черновика рукописи.

Ратнер Екатерина Юрьевна: подбор материалов исследования, экспериментальная работа, статистическая обработка, составление черновика рукописи.

Сабиров Алексей Германович: анализ научной работы, критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания, редактирование черновика рукописи.

Абрамова Зинаида Ивановна: анализ научной работы, критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания, редактирование черновика рукописи.

Денека Александр Ярославович: разработка концепции научной работы, статистическая обработка, редактирование черновика рукописи.

Финансирование

Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ 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.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ABOUT THE AUTHORS

Maria V. Tikhomirova, Junior Researcher, Research Laboratory “Molecular Foundations of the Pathogenesis and Therapy of Tumor Diseases”, Kazan (Privolzhsky) Federal University (Kazan, Russia). Researcher ID (WOS): AAF-8922-2019. Author ID (Scopus): 57218905317. ORCID: 0000-0001-9357-3649.

Vitaliy V. Barmin, MD, PhD, Thoracic Surgeon, P.A. Hertsen Moscow Oncology Research Institute – Branch of the National Medical Research Radiological Center of the Ministry of Health of the Russia (Moscow, Russia). Researcher ID (WOS): ABF-2617-2020. Author ID (Scopus): 55460197600.

Yuliya A. Topchu, Junior Researcher, Scientific Research Laboratory “Molecular Foundations of the Pathogenesis and Therapy of Tumor Diseases”, Kazan (Privolzhsky) Federal University (Kazan, Russia). Researcher ID (WOS): M-5368-2014. Author ID (Scopus): 57221785324. ORCID: 0000-0001-9105-5207.

Alexandra M. Mazitova, Junior Researcher, Scientific Research Laboratory “Molecular Foundations of the Pathogenesis and Therapy of Tumor Diseases”, Kazan (Privolzhsky) Federal University (Kazan, Russia). Researcher ID (WOS): B-8410-2019. Author ID (Scopus): 57003759900. ORCID: 0000-0002-9523-0698.

Ekaterina Yu. Ratner, MD, Oncologist, Department of Chemotherapy No. 1, M. Sigal Republic Clinical Cancer Center (Kazan, Russia). Author ID (Scopus): 57221997470.

Aleksey G. Sabirov, MD, PhD, M. Sigal Republic Clinical Cancer Center (Kazan, Russia). Author ID (Scopus): 57219981849.

Zinaida I. Abramova, DSc, Chief Researcher of the Research Laboratory “Molecular Foundations of the Pathogenesis and Therapy of Tumor Diseases”, Kazan (Privolzhsky) Federal University (Kazan, Russia). Researcher ID (WOS): N-6976-2013. Author ID (Scopus): 24833015100. ORCID: 0000-0003-3749-3411.

Alexander Ya. Deneka, PhD, Senior Researcher, Scientific Research Laboratory “Molecular Foundations of the Pathogenesis and Therapy of Tumor Diseases”, Kazan (Privolzhsky) Federal University (Kazan, Russia). E-mail: denekaalex@gmail.com. Researcher ID (WOS): Q-7273-2017. Author ID (Scopus): 56703288700. ORCID: 0000-0003-2448-5156.

AUTHOR CONTRIBUTION

Maria V. Tikhomirova: data collection, experimental work, statistical processing, drafting of the manuscript.

Vitaliy V. Barmin: analysis of the scientific work, critical revision with the introduction of valuable intellectual content, editing the draft of the manuscript.

Julia A. Topchu: selection of research materials, experimental work, statistical processing, drafting of the manuscript.

Alexandra M. Mazitova: selection of research materials, experimental work, statistical processing, drafting of the manuscript.

Ekaterina Yu. Ratner: selection of research materials, experimental work, statistical processing, drafting of the manuscript.

Aleksey G. Sabirov: analysis of the scientific work, critical revision with the introduction of valuable intellectual content, editing of the draft manuscript.

Zinaida I. Abramova: analysis of the scientific work, critical revision with the introduction of valuable intellectual content, editing the draft of the manuscript.

Alexander Ya. Deneka: development of the concept of scientific work, statistical processing, editing the draft of the manuscript.

Funding

This research was funded by a Russian Science Foundation project 18-75-00104 and by the Russian Government Program for Competitive Growth of Kazan Federal University.

Conflict of interests

The authors declare that they have no conflict of interest.