

УДК 57.032

HECTD2 СУПРЕССИРУЕТ ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЛЕТОК КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА, НАПРАВЛЯЯ LPCAT1 НА УБИКВИТИНИРОВАНИЕ И ДЕГРАДАЦИЮ^{1, 2}

© 2022 г. L. Ma^a, D. H. Li^a, Z. Xu^a, *

^aDepartment of General Surgery, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao University, Qingdao, 266000 China

*e-mail: xuzhixuzhi1981@163.com

Поступила в редакцию 09.11.2021 г.

После доработки 29.12.2021 г.

Принята к публикации 29.12.2021 г.

Колоректальный рак (КРР) представляет собой злокачественное новообразование, характеризующееся плохой общей выживаемостью и высокой частотой рецидивов, в то время как биомаркеры КРР еще плохо изучены. Нами обнаружено, что лизофосфатидилхолинацилтрансфераза-1 (LPCAT1) высоко экспрессирована при КРР, а сверхэкспрессия LPCAT1 значительно облегчала пролиферацию клеток КРР, в то время как дефицит LPCAT1 приводил к обратному эффекту. Кроме того, содержащий HECT-домен белок-2 (HECT domain-containing 2 protein; HECTD2) идентифицирован как посттрансляционный медиатор LPCAT1, так как при иммунопреципитации анти-LPCAT1-антителами находился в комплексе с высокоубиквитинированным LPCAT1. Кроме того, повышенная экспрессия *LPCAT1* восстанавливала пролиферацию клеток КРР, нарушенную сверхэкспрессией *HECTD2*. На основании полученных данных ось HECTD2/LPCAT1 можно считать потенциальным прогностическим биомаркером КРР.

Ключевые слова: колоректальный рак, LPCAT1, HECTD2, убиквитинирование, пролиферация клеток

DOI: 10.31857/S0026898422040073

Колоректальный рак (КРР) – распространенное злокачественное заболевание, которое занимает второе место по смертности от онкологических заболеваний во всем мире: в 2020 году от него скончалось около 935 000 человек [1]. Считается, что хирургическая резекция, лучевая терапия и химиотерапия могут быть использованы для лечения КРР, однако прогноз остается неблагоприятным из-за высокой частоты рецидивов [2]. В связи с этим необходимо выяснить механизмы, участвующие в прогрессировании КРР, и биомаркеры, предсказывающие рецидив заболевания.

Лизофосфатидилхолинацилтрансфераза-1 (LPCAT1) относится к важным ферментам, которые участвуют в процессе метаболизма липидов [3], обладает ацетилтрансферазной активностью и находится в аппарате Гольджи, эндоплазматическом ретикулуме и других органеллах клетки [4]. На основании накопленных данных по структуре, функциям и механизмам регуляции LPCAT1 доказана функциональная роль LPCAT1 в синтезе альвеолярного сурфактанта [5], дегенерации сет-

чатки [6] и заболеваниях нервной системой [7]. Недавно обнаружено, что уровень LPCAT1 повышен при различных видах злокачественных опухолей, таких как рак эндометрия [8], рак простаты [9] и аденокарцинома легких [10]. Кроме того, F. Mansilla и соавт. [11] пришли к выводу, что LPCAT1 может способствовать накоплению метаболитов холина, изменяя липидный профиль КРР. Однако другие механизмы, опосредованные LPCAT1 при КРР, и функциональная роль LPCAT1 в прогрессировании КРР пока не выяснены.

Убиквитинирование – распространенная посттрансляционная модификация [12]. В ходе этого процесса ряд ферментов, включая активирующие убиквитин, конъюгирующие убиквитин, лигирующие и деградирующие, выступают в качестве важнейших участников, которые сортируют внутриклеточные белки, выбирают и специфически модифицируют убиквитином белки-мишени [13, 14]. Показано, что убиквитинирование играет решающую роль в регуляции локализации, метаболизма и деградации белков [15]. Кроме того, доказано, что убиквитинирование участвует в регуляции практически всех видов жизнедеятельности, таких как клеточный цикл [16], пролиферация [17], апоптоз и аутофагия [18], дифференциация [19], метастазирование [20], воспаление и имму-

¹ Текст представлен авторами на английском языке.

² Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026898422040073 для авторизованных пользователей.

Сокращения: КРР – колоректальный рак.

нитет [21]. Функционально значимый, грандиозный механизм убиквитинирования уже исследован достаточно детально при различных видах злокачественных опухолей, таких как рак молочной железы [20], немелкоклеточный рак легкого [17] и внутрипеченочная холангиокарцинома [22]. Кроме того, E3-убиквитинлигаза, содержащий HECT-домен белок-2 (HECTD2), участвует в прогрессировании различных заболеваний, таких как бактериальное воспаление легких [23], экспериментальное повреждение легких [24] и рак простаты [25]. Однако вклад HECTD2-опосредованного убиквитинирования в развитие КРР еще предстоит изучить.

Учитывая решающую роль LPCAT1 в росте и метастазировании злокачественных опухолей, мы оценили уровни LPCAT1 и исследовали биологическую функцию этого белка при КРР. Кроме того, выясняли, может ли HECTD2 опосредовать убиквитинирование LPCAT1. В результате проведенного исследования выявлено функциональное влияние оси HECTD2/LPCAT1 на прогрессирование КРР, что позволяет считать ее потенциальной мишенью для разработки терапевтической стратегии КРР.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Биоинформационный анализ. Экспрессия LPCAT1 в тканях КРР и нормальных тканях толстой кишки была извлечена из базы данных ENCORI [26] и базы данных Human Protein Atlas [27].

Коллекция тканей и культура клеток. Четыре фиксированных в формалине и парафинированных ткани КРР и соответствующие нормальные ткани были получены из Муниципальной больницы Циндао, Университет Циндао (Qingdao Municipal Hospital, Qingdao University, Китай).

От каждого пациента было получено информированное согласие. Экспериментальная стратегия проводилась в соответствии с Хельсинкской декларацией и была одобрена этическим комитетом Муниципальной больницы Циндао, Циндаоского университета.

Клеточные линии КРР: LOVO и AGS – были приобретены в Американской коллекции типовых культур (American Type Culture Collection, США). Клетки культивировали в среде RPMI 1640, содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (FBS; “Invitrogen”, США) в увлажненной атмосфере 5% CO₂ при 37°C.

Иммуноблотинг. Суммарный белок выделяли из клеток или тканей КРР с помощью буфера для лизиса RIPA, белки разделяли электрофорезом в SDS-ПААГ и переносили на PVDF-мембрану. Мембрану блокировали 5%-ным обезжиренным молоком в течение 1 ч при комнатной температуре и инкубировали с моноклональными кроличьими антителами против LPCAT1 (1/2000;

ab214034, “Abcam”, Великобритания), HECTD2 (1/3000; ab173572, “Abcam”) и GAPDH (1/1000; ab181602, “Abcam”) в течение ночи при 4°C. После этого мембраны обрабатывали вторичными антителами – конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP) козьими антителами против кроличьего IgG (1/1000; ab97051, “Abcam”). Полосы визуализировали с использованием хемилюминесцентного субстрата – Chemistar™ High-sig ECL Western Blotting Substrate (“Tanon Science & Technology Co., Ltd.”, Китай).

Трансфекция клеток. Конструкты pcDNA-LPCAT1 (pLPCAT1), pcDNA-HECTD2 (pHECTD2), sh-LPCAT1-1 и sh-LPCAT1-2 и соответствующие пустые плазмиды и векторы, экспрессирующие скремблированную shРНК (NC), были разработаны компанией “Genechem” (Китай) (табл. S1 Приложения, см. Дополнительные материалы на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2022/4/supp_Ma_rus.pdf). С помощью реагента для трансфекции Lipofectamine 2000 (11668-019; “Invitrogen”, США) плазмиды и лентивирусы, несущие shРНК, трансфицировали в клетки КРР в соответствии с инструкциями производителя.

Количественная ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Для выделения суммарной РНК из клеток или тканей КРР использовали реагент Trizol (“Absin”, Китай), а для обратной транскрипции и амплификации кДНК – набор PrimeScript RT Reagent Kit (DRR037A; “Takara”, Япония) и SYBR Master Mix (“Takara”) соответственно. Относительная экспрессия HECTD2 и LPCAT1 была нормализована на GAPDH и рассчитана методом 2^{-ΔΔCt}. Последовательности праймеров представлены в табл. S2 Приложения.

Анализ образования колоний. Клетки КРР вносили в 6-луночный планшет (2 × 10³ клеток/лунка) на 12 суток. После фиксации с помощью параформальдегида клетки окрашивали 0.5%-ным раствором кристаллического фиолетового. Клонированные клетки подсчитывали и визуализировали под световым микроскопом.

Подсчет клеток. Для подсчета клеток использовали набор Cell Counting kit-8 (ССК-8; #C0038, “Beoyotime”, Китай). В лунки 96-луночного планшета вносили по 4 × 10³ клеток КРР в 100 мкл клеточной суспензии и инкубировали с реагентом ССК-8 (10 мкл/лунка; “Beoyotime”) в течение 24, 48, 72 и 96 ч. Через 1 ч инкубации при 37°C измеряли оптическую плотность при 450 нм (OD₄₅₀) на микропланшетном ридере.

Окрашивание 5-этинил-2'-дезоксинуридин (EdU). При оценке жизнеспособности клеток КРР анализировали включение в них EdU, используя EdU kit (“Roche”, Швейцария) в соответствии с инструкциями производителя. EdU-позитивные клетки визуализировали с помощью флуорес-

центного микроскопа Zeiss (“Carl Zeiss”, Германия) на пяти случайных полях и подсчитывали с помощью программного обеспечения Image-Pro Plus 6.0 (“Media Cybernetics”, США).

Анализ коиммунопреципитации (Co-IP). Для выделения суммарного белка из клеток KPP использовали буфер для лизиса Co-IP (“Beyotime”), Dynabeads Protein G (1004D, “Life Technologies”, США) инкубировали в течение 2 ч с кроличьими моноклональными антителами против HA-tag (#3724; “Cell Signaling Technology”, США) или поликлональными против DDDK-tag (связывают Flag) (ab1162; “Abcam”). Затем белковый лизат инкубировали с комплексом антитело–магнитные бусины при 4°C в течение ночи. Бусины промывали элюирующим буфером, а иммунопреципитат и входящие в него белки анализировали методом иммуноблоттинга.

Масс-спектрометрия. После процедуры Co-IP очищенный HECTD2 и его иммунопреципитаты анализировали методом жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (LC-MS/MS) на системах Expert TM nanoLC (“Thermo Fisher Scientific”, США) и AB Sciex TripleTOF® 5600+ (“Sciex”, США) по протоколам производителей.

Анализ убиквитинирования. Клетки KPP трансфицировали плазмидами, несущими гены, кодирующие HA-HECTD2, Flag-LPCAT1, His-ub (убиквитин с гистидиновой меткой) или His-ub-K63R (His-меченый убиквитин с заменой Lys63 на Arg), и инкубировали с протеасомным ингибитором MG132 (10 мкМ; “Sigma”, США) в течение 6 ч. Flag-LPCAT1 осаждали анти-Flag-антителами и проводили иммуноблоттинг, в котором использовали антитела против убиквитина (#3936, “Cell Signaling Technology”).

Анализ полураспада. Для оценки стабильности белка LPCAT1 клетки KPP трансфицировали рHECTD2 и обрабатывали циклогексимидом (“Sigma”) в концентрации 40 мМ в течение 0, 2, 4 и 6 ч. Белки лизатов, полученных в результате лизиса клеток, разделяли электрофорезом в SDS-ПААГ и затем анализировали иммуноблоттингом.

Статистический анализ. Данные анализировали с помощью программы GraphPad Prism 5.01 и представляли как среднее ± стандартное отклонение (SD). Для анализа различий между двумя или несколькими группами использовали *t*-тест Стьюдента и дисперсионный анализ (ANOVA). Различия считали значимыми при *p*-value < 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспрессия LPCAT1 активируется при колоректальном раке

Уровни белка LPCAT1 оценили в тканях KPP и соответствующих нормальных тканях и обнару-

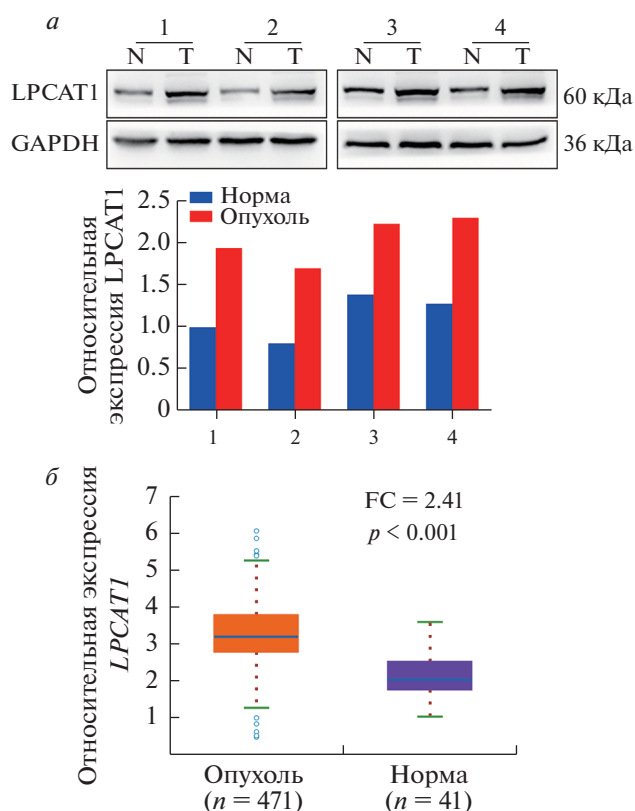


Рис. 1. Повышенная экспрессия *LPCAT1* при KPP. *а* – Экспрессия *LPCAT1* в клинических образцах опухолевых тканей KPP и соответствующих нормальных тканей, полученных от 4 пациентов (образцы 1–4). Иммуноблоттинг проведен с антителами против *LPCAT1*. *б* – Результаты анализа базы данных ENCORI по экспрессии *LPCAT1* при KPP. FC – кратность изменения; *p* – логарифмический ранговый критерий.

жили, что *LPCAT1* высоко экспрессирован в опухолевых тканях KPP (рис. 1*а*). Для проверки этого результата мы проанализировали базы данных ENCORI (<http://www.sysu.edu.cn/>) и выявили гораздо более высокие уровни мРНК *LPCAT1* в опухолевых тканях по сравнению с нормальными тканями в образцах KPP, представленными в базе The Cancer Genome Atlas (TCGA; <https://www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/research/structural-genomics/tcga>) (рис. 1*б*). В совокупности эти данные свидетельствуют о высокой экспрессии *LPCAT1* при KPP.

При повышенной экспрессии LPCAT1 ускоряется пролиферация клеток колоректального рака

Для изучения функциональной роли *LPCAT1* при KPP мы создали клетки AGS и LOVO, сверхэкспрессирующие *LPCAT1*, и исследовали эффективность трансфекции (рис. 2*а* и 2*б*). По результатам анализов колониеобразования (рис. 2*в*) и ССК-8 (рис. 2*г*) при сверхэкспрессии *LPCAT1* повышается скорость пролиферации клеток KPP,

а также значительно увеличивается число клеток, инкорпорировавших EdU (рис. 2д). В целом, полученные данные подтвердили канцерогенную роль LPCAT1 при КРР.

При дефиците LPCAT1 скорость пролиферации клеток колоректального рака снижена

Учитывая, что повышенный уровень LPCAT1 способствовал пролиферации клеток КРР, мы проверили биологический эффект истощения LPCAT1 на эти клетки. Для функциональных экспериментов LPCAT1-истощенные клетки КРР получили с использованием коротких интерферирующих РНК (siРНК), нацеленных на мРНК LPCAT1 (рис. 3а и 3б). По результатам колониеобразования (рис. 3в) и ССК-8 (рис. 3г) истощение по LPCAT1 приводило к снижению скорости пролиферации клеток КРР. Кроме того, EdU-анализ показал, что при дефиците LPCAT1 явно снижалось содержание EdU-позитивных клеток (рис. 3д). Таким образом, на основании полученных результатов можно говорить о том, что дефицит LPCAT1 индуцирует замедление пролиферации клеток КРР.

HECTD2 убиквитинирует LPCAT1 в клетках колоректального рака

После сверхэкспрессии Flag-HECTD2 в клетках LOVO, последующей иммунопреципитации анти-Flag-антителами проведен масс-спектрометрический анализ осажденных белков. Вместе с белком HECTD2 соосаждался белок LPCAT1, из чего можно строить гипотезу о их взаимодействии (рис. 4а). Кроме того, уровень HECTD2 в тканях КРР был ниже, чем в нормальных тканях (рис. 4б и 4в).

С целью исследовать взаимодействие между HECTD2 и LPCAT1 мы проведен анализ Co-IP и обнаружили, что HECTD2 с Flag-тегом интенсивно соосаждается с LPCAT1 в клетках КРР (рис. 4г). Кроме того, по данным анализа убиквитинирования сверхэкспрессия HECTD2 повышает уровень убиквитинирования LPCAT1 (рис. 4д). Для проверки этих результатов оценили период полужизни белка LPCAT1 и обнаружили, что он сокращается при сверхэкспрессии HECTD2, то есть HECTD2 снижает стабильность белка LPCAT1 (рис. 4е). В результате проведенного исследования показано, что HECTD2 функционирует как E3-убиквитинлигаза, “руководящая” убиквитинированием и деградацией белка LPCAT1 при КРР.

HECTD2 супрессирует пролиферацию клеток колоректального рака через убиквитинирование LPCAT1

С целью определить, действует ли HECTD2 как канцерогенный драйвер прогрессирования

КРР LPCAT1-зависимым образом, плазмиды со сверхэкспрессией HECTD2 и LPCAT1 совместно трансфицировали в клетки КРР (рис. 5а). Обнаружено, что сверхэкспрессия HECTD2 приводила к значительному снижению пролиферативной активности клеток КРР, которая восстанавливалась при сверхэкспрессии LPCAT1 (рис. 5б и 5в). Кроме того, сверхэкспрессия LPCAT1 играла критическую роль в восстановлении числа EdU-позитивных клеток, потеря которых была вызвана сверхэкспрессией HECTD2 (рис. 5г). В совокупности эти результаты показали, что HECTD2 подавляет прогрессирование КРР посредством убиквитинирования LPCAT1.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нами показано, что LPCAT1 действует как канцерогенный фактор при КРР, в то время как HECTD2 идентифицирован как белок, способствующий убиквитинированию и деградации белка LPCAT1. Таким образом, определена функциональная роль оси HECTD2/LPCAT1 в прогрессировании КРР.

Ранее сообщалось об онкогенной роли LPCAT1 при различных видах злокачественных образований, таких как рак желудка [28], плоскоклеточный рак полости рта [29] и рак предстательной железы [30]. В частности, F. Liu и др. [31] продемонстрировали, что LPCAT1 необходим для пролиферации клеток при многих онкологических заболеваниях, а повышенная экспрессия LPCAT1 тесно связана с плохим прогнозом. P. Lebok и др. [32] выявили, что сверхэкспрессия LPCAT1 способствует росту опухоли при раке молочной железы и ассоциируется с плохим прогнозом. Кроме того, Y. Du и соавт. [33] пришли к выводу, что позитивная регуляция LPCAT1 индуцирует пролиферацию и инвазию клеток при светлоклеточной почечно-клеточной карциноме. Соответственно нами показано, что экспрессия LPCAT1 повышена в тканях КРР. Трансфекция клеток КРР плазмидами, обеспечивающими сверхэкспрессию LPCAT1 или подавляющими ее под действием siРНК к LPCAT1, приводила соответственно к ускоренной пролиферации клеток или наоборот ее замедлению при истощении по LPCAT1.

Уже показано, что убиквитинирование играет важную роль в регуляцию прогрессии злокачественных новообразований, в том числе при КРР. Так, J. Hu и соавт. [34] сообщали, что TRIM39 стимулирует активность Rab7 через супрессию его убиквитинирования, тем самым сдерживая аутофагический поток и метастазирование опухоли при КРР, а B. Li и др. [35] показали, что USP10 повышает уровень деубиквитинирования NLRP7, способствуя росту опухоли и коррелируемой злокачественной опухолью поляризации макрофагов при КРР. В проведенном нами ис-

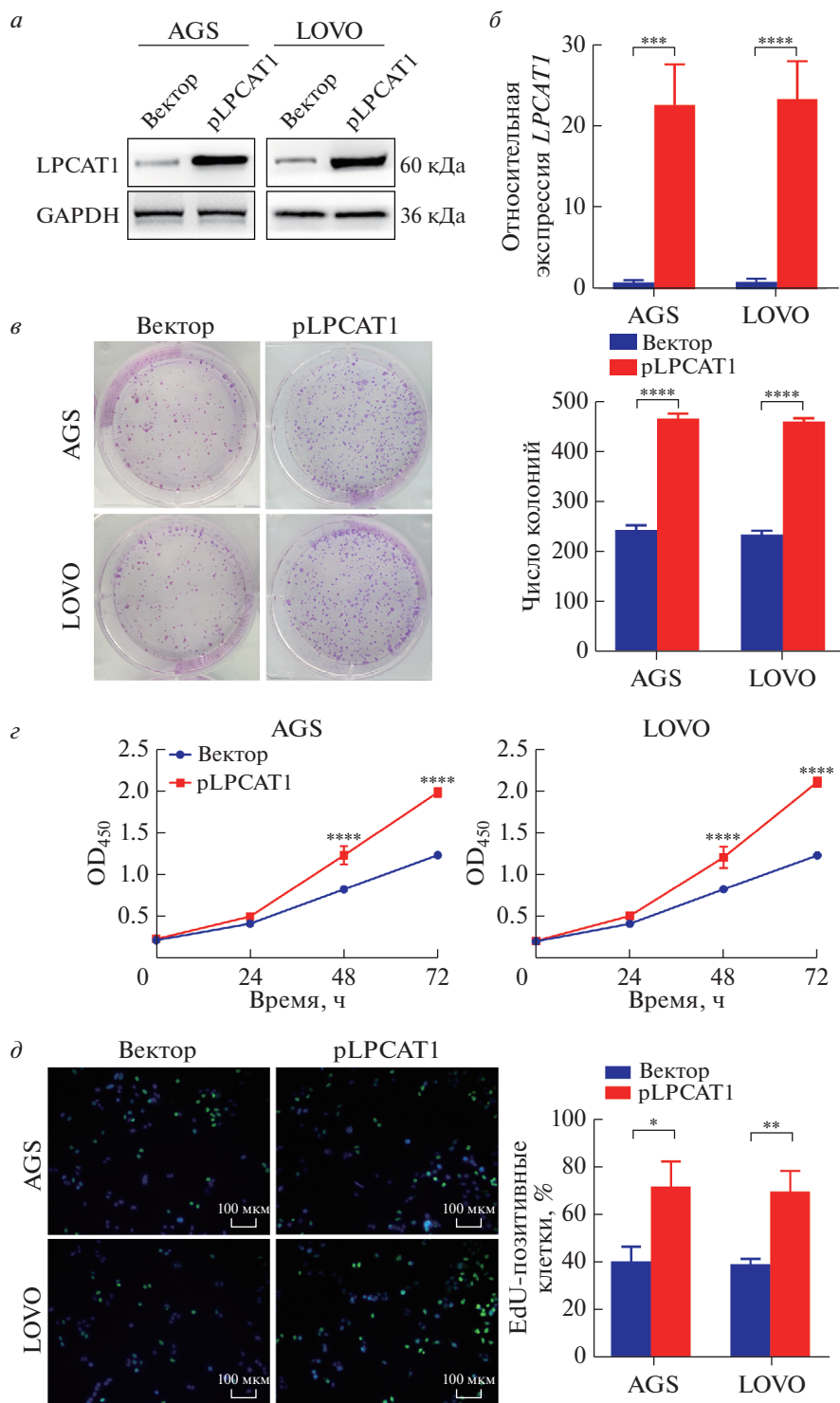


Рис. 2. Повышенный уровень LPCAT1 способствует пролиферации клеток КРР. Клетки КРР трансфицировали плазмидами, содержащими ген *LPCAT1*, и анализировали эффективность экспрессии целевого гена методом иммуноблоттинга (а) и количественной ОТ-ПЦР (б). Для оценки скорости пролиферации клеток КРР использовали тесты колониобразования (в), ССК-8 (г) и EdU (д). Все эксперименты выполнены в трех повторах, данные представлены как среднее \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ и **** $p < 0.0001$.

следовании *HECTD2* интенсивно соосаждался с *LPCAT1* в экспериментах по коиммунопреципитации и идентифицирован как возможный парт-

нер *LPCAT1* на основании данных масс-спектрометрии. Более того, сверхэкспрессия *HECTD2* приводила к повышению уровня убиквитиниро-

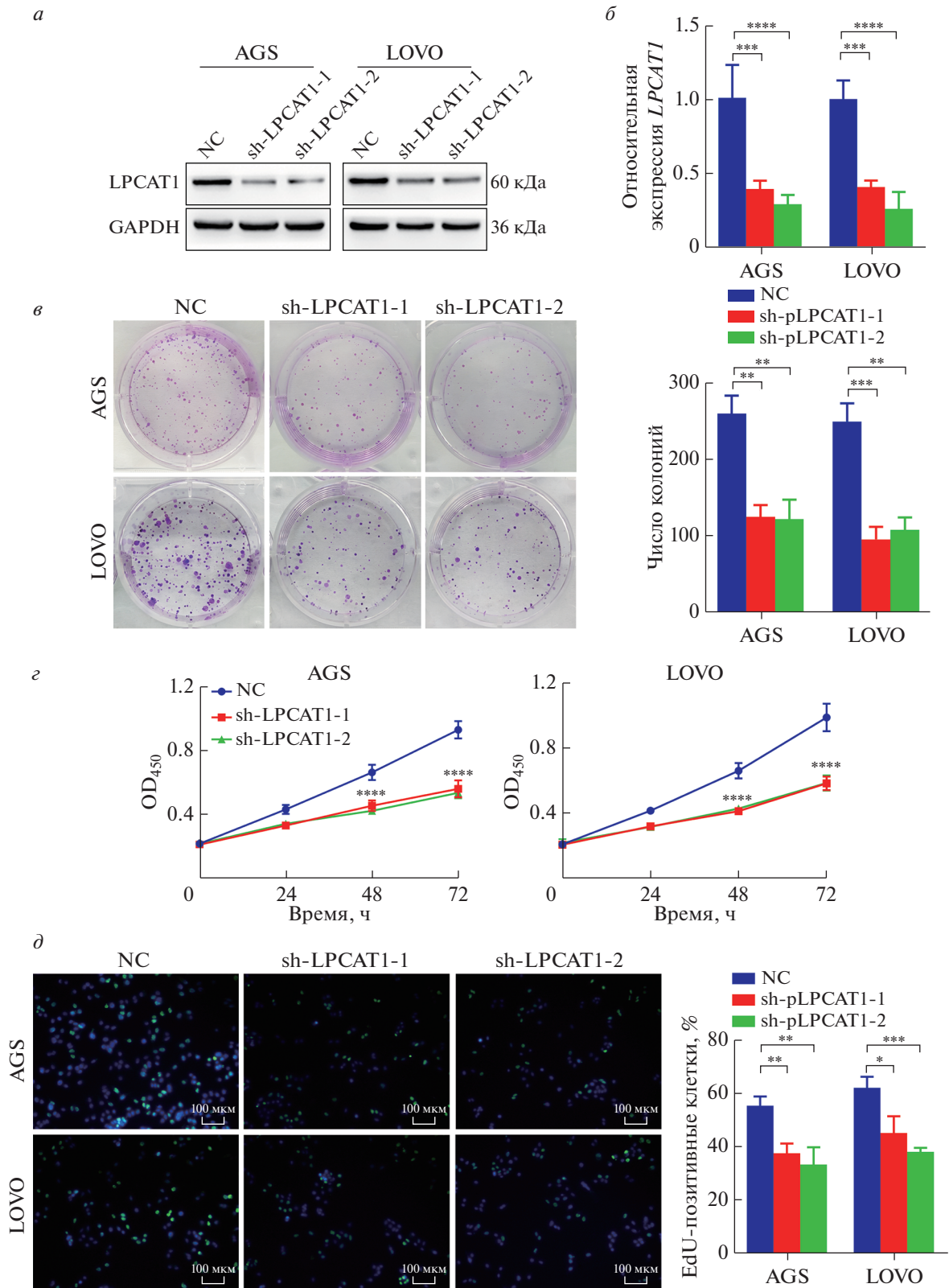


Рис. 3. При дефиците LPCAT1 замедляется пролиферация клеток КРР. Клетки КРР трансдуцировали лентивирусами, несущими shРНК к гену *LPCAT1* (sh-LPCAT1) или скремблированную shРНК (NC). Экспрессию *LPCAT1* оценивали методом иммуноблоттинга (а) и количественной ОТ-ПЦР (б). Скорость пролиферации клеток КРР оценивали методами колониеобразования (в), ССК-8 (г) и EdU (д). Все эксперименты выполнены в трех повторах, данные представлены как среднее ± SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ и **** $p < 0.0001$.

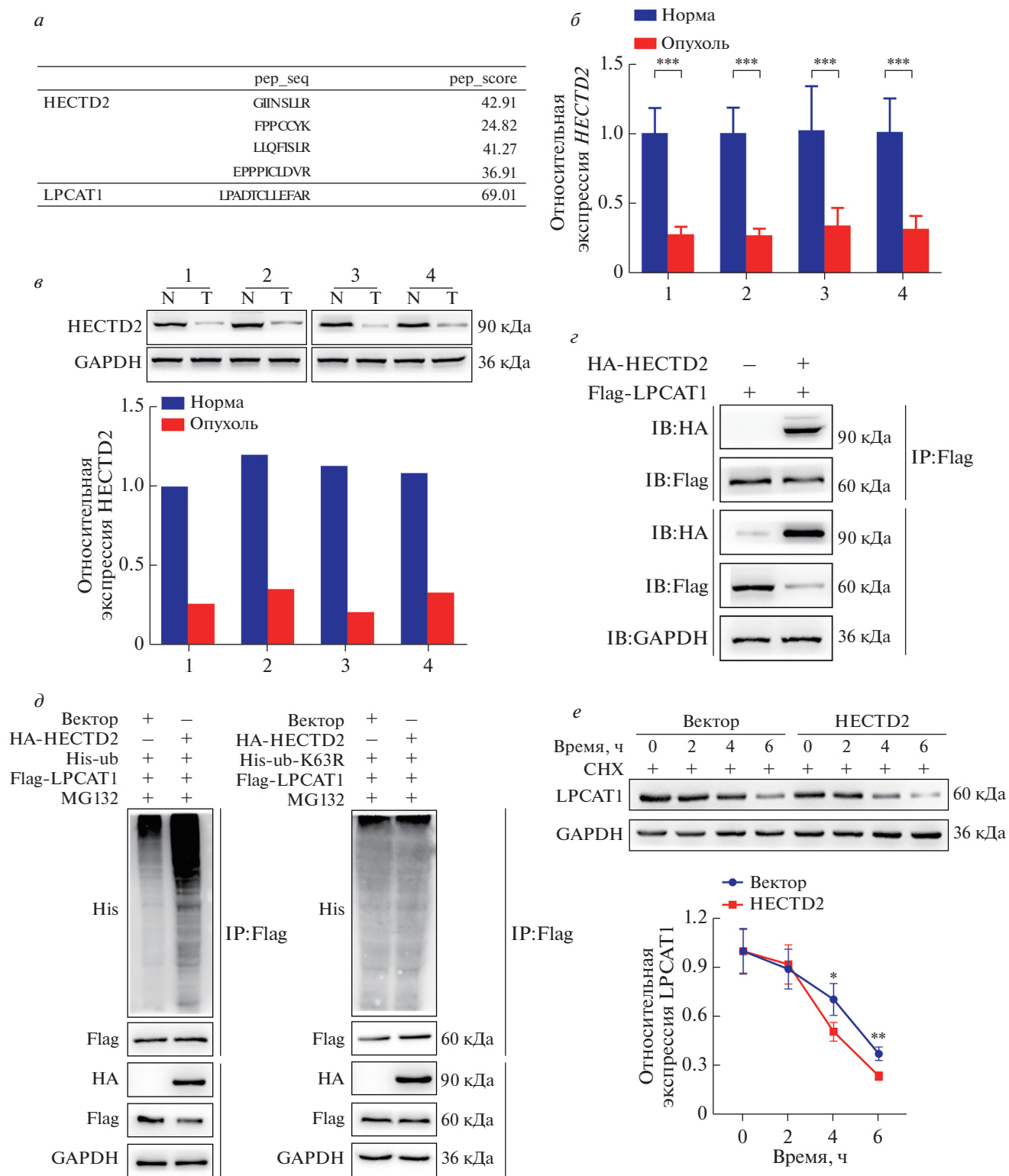


Рис. 4. В клетках KPP HECTD2 убиквитинирует LPCAT1. Для идентификации белков, взаимодействующих с LPCAT1, использована масс-спектрометрия (а). Уровень экспрессии *HECTD2* в тканях KPP (Т) и нормальных тканях (N) оценивали методом количественной ОТ-ПЦР (б) и иммуноблотинга (в). Взаимодействие между HECTD2 и LPCAT1 оценивали с использованием Co-IP и убиквитинирования. В клетках LOVO сверхэкспрессировали Flag-LPCAT1 или HA-HECTD2, и белок Flag-LPCAT1 осаждали анти-Flag-антителами (IP:Flag), после чего проводили иммуноблотинг (IB) с анти-Flag- и анти-HA-антителами (г). Анализ на убиквитинирование проводили в клетках LOVO, трансфицированных His-ub или His-ub-K63R (д). Уровень белка LPCAT1 исследовали через 0, 2, 4 и 6 ч после обработки клеток циклогексимидом (CHX) (е). Все эксперименты проведены в трех повторах, данные представлены как среднее значение \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ и **** $p < 0.0001$.

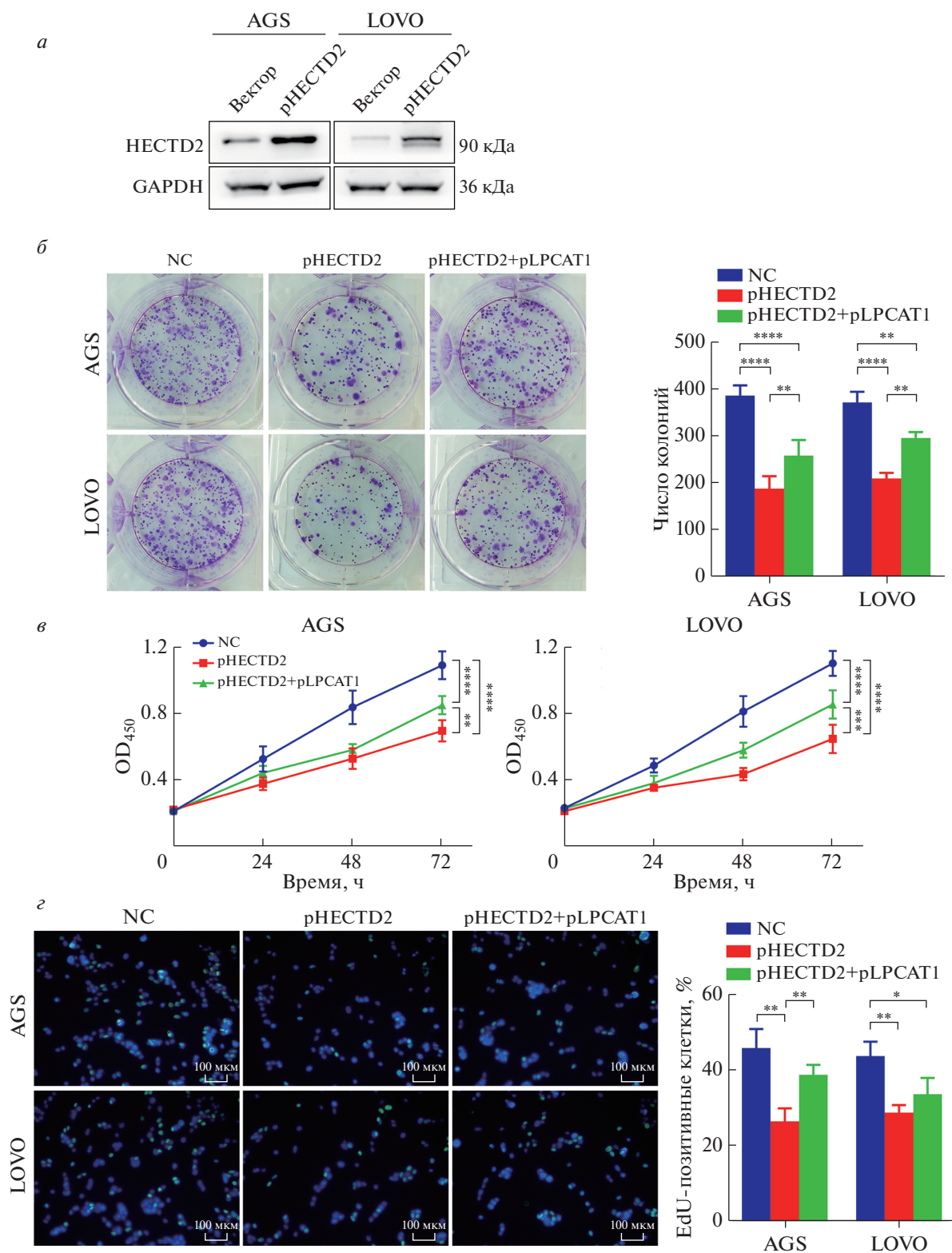


Рис. 5. HECTD2 супрессирует пролиферацию клеток КРР через убиквитинирование LPCAT1. Клетки КРР котрансфицировали плазмидами, экспрессирующими *HECTD2* (pHECTD2) и *LPCAT1* (pLPCAT1), и оценивали эффективность трансфекции методом иммуноблотинга (а). Пролиферацию клеток КРР оценивали методами колониеобразования (б), ССК-8 (в) и включения EdU (г). Все эксперименты проведены в трех повторах, данные представлены как среднее \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ и **** $p < 0.0001$. NC – отрицательный контроль.

вания белка LPCAT1 и индуцировала его деградацию. Ранее в моделях пневмонии показано, что HECTD2 усиливает воспаление через убиквитинирование белка PIAS1 и его деградацию [24]. Однако нами выявлено, что сверхэкспрессия HECTD2 подавляла пролиферацию клеток КРР, которая восстанавливалась при повышении уровня LPCAT1. В некоторых исследованиях сообщалось о повышенной экспрессии 19S-регулятора при КРР [36, 37]. Этот регулятор распознает убиквитинированные белки и направляет их в протеасомы для деградации. Интересно, что, несмотря на повышенное количество 19S-регулятора, экспрессия HECTD2 при КРР снижена, что позволяет опухоли поддерживать уровень LPCAT1.

Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать вывод, что LPCAT1, по-видимому, способствует прогрессированию КРР, а HECTD2 – убиквитинированию и деградации белка LPCAT1, тем самым ограничивая пролиферацию клеток КРР. Таким образом, ось HECTD2/LPCAT1 можно рассматривать в качестве потенциального прогностического биомаркера при колоректальном раке.

Это исследование не получило какого-либо специального гранта от финансирующих агентств в государственном, коммерческом или некоммерческом секторах.

Все эксперименты проведены в соответствии с Хельсинкской декларацией и были одобрены Комитетом по этике Муниципальной больницы Циндао Университета Циндао (Qingdao Municipal Hospital, Qingdao University, Китай).

Все испытуемые согласились участвовать в данном исследовании и подписали полную форму информированного согласия.

Вклад авторов: Lei Ma и Zhi Xu разработали экспериментальную стратегию. Lei Ma и Dehui Li провели эксперименты и проанализировали результаты. Рукопись подготовлена Lei Ma и отредактирована Zhi Xu. Все авторы одобрили окончательный вариант рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- (2020) Erratum: Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* **70**, 313.
- Feng M., Zhao Z., Yang M., Ji J., Zhu D. (2021) T-cell-based immunotherapy in colorectal cancer. *Cancer Lett.* **498**, 201–209.
- Barbosa A., Savage D., Siniouoglou S. (2015) Lipid droplet-organelle interactions: emerging roles in lipid metabolism. *Curr. Opin. Cell Biol.* **35**, 91–97.
- Shindou H., Hishikawa D., Harayama T., Yuki K., Shimizu T. (2009) Recent progress on acyl CoA: lysophospholipid acyltransferase research. *J. Lipid Res.* **50**(Suppl.), S46–S51.
- Lin S., Ikegami M., Moon C., Naren A. Shannon J. (2015) Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 (LPCAT1) specifically interacts with phospholipid transfer protein StarD10 to facilitate surfactant phospholipid trafficking in alveolar type II cells. *J. Biol. Chem.* **290**, 18559–18574.
- Dai X., Zhang H., Han J., He Y., Zhang Y., Qi Y., Pang J.J. (2016) Effects of subretinal gene transfer at different time points in a mouse model of retinal degeneration. *PLoS One.* **11**, e0156542.
- Okubo M., Yamanaka H., Kobayashi K., Kanda H., Dai Y., Noguchi K. (2012) Up-regulation of platelet-activating factor synthases and its receptor in spinal cord contribute to development of neuropathic pain following peripheral nerve injury. *Mol. Pain.* **8**, 8.
- Zhao T., Zhang Y., Ma X., Wei L., Hou Y., Sun R., Jiang J. (2021) Elevated expression of LPCAT1 predicts a poor prognosis and is correlated with the tumour microenvironment in endometrial cancer. *Cancer Cell Int.* **21**, 269.
- Han C., Yu G., Mao Y., Song S., Li L., Zhou L., Wang Z., Liu Y., Li M., Xu B. (2020) LPCAT1 enhances castration resistant prostate cancer progression via increased mRNA synthesis and PAF production. *PLoS One.* **15**, e0240801.
- Wei C., Dong X., Lu H., Tong F., Chen L., Zhang R., Dong J., Hu Y., Wu G., Dong X. (2019) LPCAT1 promotes brain metastasis of lung adenocarcinoma by up-regulating PI3K/AKT/MYC pathway. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **38**, 95.
- Mansilla F., da Costa K., Wang S., Kruhoffer M., Lewin T., Orntoft T., Coleman R., Birkenkamp-Demtröder K. (2009) Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 (LPCAT1) overexpression in human colorectal cancer. *J. Mol. Med. (Berl.)* **87**, 85–97.
- Deribe Y.L., Pawson T., Dikic I. (2010) Post-translational modifications in signal integration. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 666.
- Schwartz A., Ciechanover A. (2009) Targeting proteins for destruction by the ubiquitin system: implications for human pathobiology. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **49**, 73–96.
- Jones D., Crowe E., Stevens T.A., Candido E.P.M. (2001) Functional and phylogenetic analysis of the ubiquitylation system in *Caenorhabditis elegans*: ubiquitin-conjugating enzymes, ubiquitin-activating enzymes, and ubiquitin-like proteins. *Genome Biol.* **3**(1), RESEARCH0002. <https://doi.org/10.1186/gb-2001-3-1-research0002>
- Wójcik C., DeMartino G.N. (2003) Intracellular localization of proteasomes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **35**, 579–589.
- Song Y., Wu C., Wu K., Han Q., Miao X., Ma D., Leung C. (2021) Ubiquitination regulators discovered by virtual screening for the treatment of cancer. *Front. Cell Dev. Biol.* **9**, 665646.

17. Xu Y., Wang C., Jiang X., Zhang Y., Su H., Jiang J., Ren H., Qiu X. (2021) KLHL38 involvement in non-small cell lung cancer progression via activation of the Akt signaling pathway. *Cell Death Dis.* **12**, 556.
18. Castro-Gonzalez S., Simpson S., Shi Y., Chen Y., Benjamin J., Serra-Moreno R. (2021) HIV Nef-mediated ubiquitination of BCL2: implications in autophagy and apoptosis. *Front. Immunol.* **12**, 682624.
19. Liu J., Li X., Zhou G., Zhang Y., Sang Y., Wang J., Li Y., Ge W., Sun Z., Zhou X. (2021) Silica nanoparticles inhibiting the differentiation of round spermatid and chromatin remodeling of haploid period via MIWI in mice. *Environ. Pollut.* **284**, 117446.
20. Gong Z., Li A., Ding J., Li Q., Zhang L., Li Y., Meng Z., Chen F., Huang J., Zhou D., Hu R., Ye J., Liu W., You H. (2021) OTUD7B deubiquitinates LSD1 to govern its binding partner specificity, homeostasis, and breast cancer metastasis. *Adv. Sci. (Weinh.)*. **8**(15), e2004504.
21. Shmuel-Galia L., Humphries F., Lei X., Ceglia S., Wilson R., Jiang Z., Ketelut-Carneiro N., Foley S., Pechhold S., Houghton J., Muneeruddin K., Shaffer S., McCormick B., Reboldi A., Ward D., Marshak-Rothstein A., Fitzgerald K. (2021) Dysbiosis exacerbates colitis by promoting ubiquitination and accumulation of the innate immune adaptor STING in myeloid cells. *Immunity*. **54**, 1137–1153.e8.
22. Lepore A., Choy P., Lee N., Carella M., Favicchio R., Briones-Orta M., Glaser S., Alpini G., D'Santos C., Tooze R., Lorger M., Syn W., Papakyriakou A., Giamas G., Bubici C., Papa S. (2021) Phosphorylation and stabilization of PIN1 by JNK promote intrahepatic cholangiocarcinoma growth. *Hepatology*. **74**(5), 2561–2579.
23. Kapur R., Semple J. (2016) Alleviation of gram-negative bacterial lung inflammation by targeting HECTD2. *Ann. Trans. Med.* **4**, 488.
24. Coon T., McKelvey A., Lear T., Rajbhandari S., Dunn S., Connelly W., Zhao J., Han S., Liu Y., Weathington N., McVerry B., Zhang Y., Chen B. (2015) The proinflammatory role of HECTD2 in innate immunity and experimental lung injury. *Sci. Trans. Med.* **7**, 295ra109.
25. Sun T., Wang X., He H., Sweeney C., Liu S., Brown M., Balk S., Lee G., Kantoff P. (2014) MiR-221 promotes the development of androgen independence in prostate cancer cells via downregulation of *HECTD2* and *RAB1A*. *Oncogene*. **33**, 2790–2800.
26. Li J.H., Liu S., Zhou H., Qu L.H., Yang J.H. (2014) starBase v2.0: decoding miRNA-ceRNA, miRNA-ncRNA and protein-RNA interaction networks from large-scale CLIP-Seq data. *Nucleic Acids Res.* **42**, D92–D97.
27. Uhlen M., Oksvold P., Fagerberg L., Lundberg E., Jonasson K., Forsberg M., Zwahlen M., Kampf C., Wester K., Hober S., Wernerus H., Bjorling L., Ponten F. (2010) Towards a knowledge-based Human Protein Atlas. *Nat. Biotechnol.* **28**, 1248–1250.
28. Uehara T., Kikuchi H., Miyazaki S., Iino I., Setoguchi T., Hiramatsu Y., Ohta M., Kamiya K., Morita Y., Tanaka H., Baba S., Hayasaka T., Setou M., Konno H. (2016) Overexpression of lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 and concomitant lipid alterations in gastric cancer. *Ann. Surg. Oncol.* **23**(Suppl. 2), S206–S213.
29. Shida-Sakazume T., Endo-Sakamoto Y., Unozawa M., Fukumoto C., Shimada K., Kasamatsu A., Ogawara K., Yokoe H., Shiiba M., Tanzawa H., Uzawa K. (2015) Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 overexpression promotes oral squamous cell carcinoma progression via enhanced biosynthesis of platelet-activating factor. *PLoS One*. **10**, e0120143.
30. Grupp K., Sanader S., Sirma H., Simon R., Koop C., Prien K., Hube-Magg C., Salomon G., Graefen M., Heinzer H., Minner S., Izbicki J., Sauter G., Schlomm T., Tsourlakis M. (2013) High lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 expression independently predicts high risk for biochemical recurrence in prostate cancers. *Mol. Oncol.* **7**, 1001–1011.
31. Liu F., Wu Y., Liu J., Ni R.J., Yang A.G., Bian K., Zhang R. (2020) A miR-205–LPCAT1 axis contributes to proliferation and progression in multiple cancers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **527**, 474–480.
32. Lebok P., von Hassel A., Meiners J., Hube-Magg C., Simon R., Hoflmayer D., Hinsch A., Dum D., Fraune C., Gobel C., Moller K., Sauter G., Jacobsen F., Buscheck F., Prien K., Krech T., Krech R.H., von der Assen A., Wolber L., Witzel I., Schmalfeldt B., Geist S., Paluchowski P., Wilke C., Heilenkotter U., Terracciano L., Muller V., Wilczak W., Burandt E.C. (2019) Upregulation of lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 (LPCAT1) is linked to poor prognosis in breast cancer. *Aging*. **11**, 7796–7804.
33. Du Y., Wang Q., Zhang X., Wang X., Qin C., Sheng Z., Yin H., Jiang C., Li J., Xu T. (2017) Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 upregulation and concomitant phospholipid alterations in clear cell renal cell carcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **36**, 66.
34. Hu J., Ding X., Tian S., Chu Y., Liu Z., Li Y., Li X., Wang G., Wang L., Wang Z. (2021) TRIM39 deficiency inhibits tumor progression and autophagic flux in colorectal cancer via suppressing the activity of Rab7. *Cell Death Dis.* **12**, 391.
35. Li B., Qi Z.P., He D.L., Chen Z.H., Liu J.Y., Wong M.W., Zhang J.W., Xu E.P., Shi Q., Cai S.L., Sun D., Yao L.Q., Zhou P.H., Zhong Y.S. (2021) NLRP7 deubiquitination by USP10 promotes tumor progression and tumor-associated macrophage polarization in colorectal cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **40**, 126.
36. Erokhov P.A., Kulikov A.M., Karpova Y.D., Rodoman G.V., Sumedi I.R., Goncharov A.L., Razbirin D.V., Gorelova V.S., Sharova N.P., Astakhova T.M. (2021) Proteasomes in patient rectal cancer and different intestine locations: where does proteasome pool change? *Cancers (Basel)*. **13**, 1108.
37. Boland K., Flanagan L., McCawley N., Pabari R., Kay E.W., McNamara D.A., Murray F., Byrne A.T., Ramtoola Z., Concannon C.G., Prehn J.H. (2016) Targeting the 19S proteasomal subunit, Rpt4, for the treatment of colon cancer. *Eur. J. Pharmacol.* **780**, 53–64.

HECTD2 REPRESSES CELL PROLIFERATION IN COLORECTAL CANCER THROUGH DRIVING UBIQUITINATION AND DEGRADATION OF LPCAT1

L. Ma¹, D. H. Li¹, and Z. Xu¹, *

¹ Department of General Surgery, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao University, Qingdao, 266000 China

*e-mail: xuzhixuzhi1981@163.com

Colorectal cancer (CRC) is a malignancy featured by a poor overall survival and a high recurrence rate, whereas the biomarkers for CRC remain to be investigated. Herein, it was found that lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 (LPCAT1) was highly expressed in CRC, and *LPCAT1* overexpression significantly promoted CRC cell proliferation, while it was reversed by LPCAT1 depletion. In addition, HECT domain-containing 2 (HECTD2) protein was determined as a post-translational mediator of LPCAT1 because HECTD2 co-immunoprecipitated with high ubiquitinated LPCAT1. Furthermore, upregulated LPCAT1 rescued the impairment of CRC cell proliferation caused by HECTD2 overexpression. In conclusion, our findings supported HECTD2/LPCAT1 axis as a potential prognostic biomarker in CRC.

Keywords: colorectal cancer, HECTD2, LPCAT1, ubiquitination, cell proliferation