MIR-30A И LIN28B ОБРАЗУЮТ ПЕТАЮ ДВОЙНОЙ ОТРИЦАТЕЛЬНОЙ СВЯЗИ, РЕГУЛИРУЕМУЮ PI3K, СПОСОБНЫМ ИЗМЕНЯТЬ СТЕПЕНЬ ПРОГРЕССИРОВАНИЯ РАКА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

L. Wert-Lamas¹, G. Riesco-Eizaguirre², R.I. Gregory³, P. Santisteban¹

¹Biomedical Research Institute «Alberto Sols», Мадрид, Испания

²Hospital Universitario de Móstoles, Мадрид, Испания

³Harvard Medical School, Бостон, США

Обоснование. Согласно нашим последним данным, было установлено, что супрессор опухолей miR-30a подавляется при раке щитовидной железы. С другой стороны, последние исследования на эту тему выявили, что РНК- и ДНК-связывающие белки LIN28B и HMGA2 усиливают эпителиально-мезенхимальную транзицию, играя таким образом важную роль в нарушении дифференцировки и возникновении малигнизации. И наконец, несколько авторов сошлись во мнении, что активация PI3K приводит к быстрому прогрессированию рака щитовидной железы.

Цель исследования — изучение связи между LIN28B и HMGA2, исключением miR-30a и гиперактивацией PI3K для определения их влияния на развитие рака щитовидной железы.

Материал и методы. Расчет предположительных мишеней для MiRNA осуществлялся с помощью алгоритма MiRanda. Векторы экспрессии LIN28B и miR-30a были перенесены в клеточную культуру анапластического рака щитовидной железы и в нормальную клеточную культуру щитовидной железы; мРНК и концентрация белков определялись с помощью ПЦР, Luciferase и Western Blot. Анализ величины инвазии, пролиферации и клеточный цикл был произведен с помощью клеточного счетчика и ФАК-скана соответственно.

Результаты. Алгоритм MiRanda определил множественные элементы распознавания miR30a во всех эффекторах LIN28B, HMGA2 и PI3K. Экспрессия LIN28B коррелировала с мутациями, активирующими PI3K в клеточных культурах анапластического рака щитовидной железы. Избыточная экспрессия miR30a проявилась в выключении LIN28B, HMGA2 и некоторых эффекторов PI3K, а также в увеличении концентрации белка p27 (Kip). В свою очередь избыточная экспрессия LIN28B приводила к снижению концентрации miR30a и увеличению экспрессии эффекторов HMGA2 и PI3K. Самым значительным результатом было выраженное уменьшение уровня инвазии и пролиферации в клетках, избыточно экспрессирующих miR-30a, и в то же время к увеличению данных показателей для LIN28B.

Выводы. Наши данные позволяют предположить наличие регулируемой PI3K обратной связи с двойной отрицательной петлей между miR-30a и LIN28B. Здесь активация приводит к переключению между двумя устойчивыми состояниями. Изначально высокий уровень подавляет экспрессию. После активации PI3K начинается образование LIN28B и miR-30a подавляется. Данное состояние усиливает гиперактивацию PI3K. Таким образом, обратная связь приводит к сдвигу рамки считыва-

ния при экспрессии опухолевых генов, что, в свою очередь, выражается в прогрессировании рака щитовидной железы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

Рак щитовидной железы, MicroRNA-30a, сетевые схемы, HMGA2, LIN28B, путь PI3K.

★ ★ ★

doi: 10.14341/probl201662551-52

HIPPO PATHWAY MEDIATOR TAZ ACTS AS A NEGATIVE REGULATOR OF THE SODIUM IODIDE SYMPORTER

C. Fernández Méndez, P. Santisteban

Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain

Background. TAZ/WWTR1 (transcriptional coactivator with a PDZ-binding domain) is a transcriptional cofactor involved in the Hippo Signalling pathway, which is described to have a key role in the control of cell proliferation, apoptosis, the inhibition of cell-cell contact, stem cell self-renewal and tissue regeneration. TAZ has been reported to regulate these processes through the transactivation of transcription factors in the nucleus, where it has also been shown to interact with Smad2/3-Smad4 complexes favouring nuclear accumulation under TGFβ stimulation. TAZ co-activates Pax8, a master gene of thyroid differentiation, within the thyroglobulin promoter. Furthermore, Pax8 is the main positive regulator of sodium iodide symporter (NIS) expression and it has been reported to interact with Smad3 causing NIS transcriptional repression mediated by TGFβ.

Aim — therefore, the aim of this work was to study the involvement of TAZ in the expression of NIS, since it is an important protein not only for the correct function of the thyroid gland, but also for radioiodide treatment in thyroid cancer.

Methods and results. Strikingly, we observed that TAZ negatively regulates the transcriptional activity of Pax8 within the NIS promoter. Furthermore, we provided evidence that TAZ could play an important role in the downregulation of NIS expression by TGFβ; we detected that TAZ protein is mainly located in the nucleus under treatment with this cytokine and its silencing induces a partial recovery of NIS protein and mRNA levels. Our results also demonstrated an increased expression of TAZ in thyroid carcinoma cell lines, in which NIS levels are typically decreased. Specifically, TAZ nuclear translocation is increased in those thyroid carcinoma cells with mutated BRAFV600E or when this oncogene is conditionally activated. Since we have described that this mutation increases the secretion of TGFβ, this could be connected with the decreased levels of NIS in these cells.

Conclusion. This study has shed light on the important role of the Hippo pathway in the regulation of NIS expression in thyroid cells, repressing Pax8 activity and impaired thyroid differentiation. Given that this protein has been identified to be overexpressed in thyroid carcinoma, future research of the role of TAZ in thyroid tumorigenesis will enable development of new strategies to treat thyroid cancer.

KEYWORDS

Mefiator TAZ, sodium iodide symporter, thyroid cells.

МЕДИАТОР СИГНАЛЬНОГО ПУТИ HIPPO TAZ ДЕЙСТВУЕТ КАК НЕГАТИВНЫЙ РЕГУЛЯТОР НАТРИЙ-ЙОДИДНОГО СИМПОРТЕРА

C. Fernández Méndez, P. Santisteban

Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Мадрид, Испания

Обоснование. TAZ/WWTR1 (транскрипционный коактиватор с PDZ-связывающим доменом) — это транскрипционный кофактор, задействованный в Hipro сигнальном пути, который играет ключевую роль в контроле клеточной пролиферации, апоптоза, ингибировании межклеточных контактов, самообновления стволовых клеток и регенерации тканей. Сообщалось, что TAZ регулирует эти процессы через трансактивацию транскрипции факторов в ядре, где также было показано, что он взаимодействует со Smad2/3-Smad4 комплексами, поддерживая стимуляцию ядерного накопления под действием ТРФβ (TGFβ). TAZ ко-активирует *Pax8*, основной ген дифференцировки тиреоцитов, в промоторе тиреоглобулина. Более того, *Pax8* является главным позитивным регулятором экспрессии натрий-йодидного симпортера (NIS), а также есть сообщения о том, что он взаимодействует со Smad3, вызывая транскрипционное подавление натрий-йодидного симпортера через TGFβ.

Цель исследования — изучение вовлечения TAZ в экспрессию NIS, так как он является важным белком не только для правильного функционирования щитовидной железы, но и для лечения рака щитовидной железы радиоактивным йодом.

Материал и методы, результаты. Поразительно, что мы обнаружили, что TAZ негативно регулирует транскрипционную активность *Pax8* в натрий-йодидном промоторе. Более того, мы предоставили доказательства, что TAZ может играть важную роль в снижении экспрессии натрий-йодидного симпортера под действием TGFβ; мы выявили, что TAZ-белок в основном локализуется в ядре под обработкой этим цитокином, и его контролируемое снижение активности индуцирует частичное восстановление натрий-йодидного симпортера и уровней мРНК. Наши результаты также демонстрируют повышенную экспрессию TAZ в клеточных рядах тиреоидной карциномы, в которых типично снижен уровень натрий-йодидного симпортера. Специфично, что ядерная транслокация TAZ повышена в клетках тиреоидной карциномы с мутацией BRAFV600E, или когда этот онкоген условно активирован. С тех пор как мы описали, что эта мутация повышает секрецию TGFβ, это может быть связано с пониженными уровнями натрий-йодидного симпортера в этих клетках.

Выводы. Это исследование бросило луч света на важную роль Hipro сигнального пути в регуляции натрий-йодидного симпортера в клетках щитовидной железы, подавляя активность *Pax8* и ухудшая дифференцировку тиреоцитов. При условии, что была обнаружена сверхэкспрессия этого белка при тиреоидной карциноме, дальнейшие исследования роли TAZ в онкогенезе щитовидной железы позволят развить новые стратегии лечения рака щитовидной железы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

Медиатор TAZ, натрий-йодидный симпортер, тиреоциты.

★ ★ ★

doi: 10.14341/probl201662552-53

ERK DIMERS INHIBITION IS A THERAPEUTIC TARGET IN THYROID CANCER

A. Acuña-Ruiz¹, M. A. Zaballos², G. Riesco-Eizaguirre^{3,4}, P. Crespo⁵, P. Santisteban⁴

¹Autonomous University of Madrid, Madrid, Spain

²Biomedical Research Institute of Madrid, Madrid, Spain

³Móstoles University Hospital, Madrid, Spain

⁴Biomedical Research Institute «Alberto Sols», Madrid, Spain

⁵Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (IBBTec), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Spain

Thyroid carcinoma is the most common endocrine malignancy, and its incidence is rapidly rising in the world. Its initiation and progression involves multiple genetic and epigenetic alterations whereby BRAF and RAS mutations lead to the activation of the ERK signaling pathway. Recently, significant advances have been accomplished by developing pharmacological agents directed against the kinases of the RAS-ERK pathway. However, most of the molecules tested have undesired side effects and promote drug resistance. Consequently, it is imperative to find alternative RAS-ERK pathway inhibitors. It has been shown that by inhibiting ERKs dimerization it is possible to suppress tumor progression. DEL22379, a small molecule inhibitor for ERK dimerization, has been identified to impede the growth of melanoma tumor cells driven by RAS-ERK pathway oncogenes, without affecting ERK phosphorylation (Cancer Cell 28:17082, 2015). The aim of this work is to study the role played by ERK dimerization and its inhibition using DEL22379 in thyroid cancer progression. We have used an *in vitro* model of thyroid tumor cells harboring oncogenic drivers (RAS or BRAF) to complete viability, migration and invasion assays as well as an orthotopic mouse model with anaplastic cells as an *in vivo* model. We observed that in BRAF mutated cells, ERK dimer formation is sustained for longer compared to the RAS mutated or control cells, resulting in the altered activation of the effected signaling pathway. RAS mutated cells are resistant to DEL22379 *in vitro*, while BRAF mutated cells are not able to form ERK dimers upon inhibitor addition. Consequently, these cells lose their invasive and migratory potential as well as displaying low viability. Preliminary results suggest DEL22379 treatment inhibits tumor growth in orthotopic mice. These results describe a new molecule that could be effectively used as a therapy in thyroid cancers harboring BRAF or RAS mutated genes. We have observed it is able to partially revert the tumorigenic phenotype, which may result in an improved prognosis in thyroid cancer patients.

KEYWORDS

Thyroid cancer, ERK Dimers Therapy.