



УДК 616.441.-006.6:611.441.018.13

<http://dx.doi.org/10.15407/dopovidi2016.01.105>

Б. Б. Гуда, В. М. Пушкар'юв, О. В. Журавель, А. Є. Коваленко,
В. В. Пушкар'юв, Ю. М. Таращенко, Л. Ю. Зурнаджи,
О. І. Ковзун, член-кореспондент НАН України М. Д. Тронько

ДУ "Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка НАМН України",
Київ

E-mail: pushkarev.vm@gmail.com

Експресія та активність позаклітинної сигнал-регульованої кінази-1/2 (ERK1/2) в нормальних тканинах та пухлинах щитоподібної залози людини

Вивчено експресію та активацію головної ефекторної кінази мітогенного каскаду — позаклітинної сигнал-регульованої кінази-1/2 (ERK1/2) в нормальних тканинах, доброякісних та злоякісних пухлинах щитоподібної залози людини. Показано, що загальний вміст ERK у всіх досліджених пухлинах, крім зоба, значно нижчий в пухлинній тканині порівняно з нормальними тканинами. Активність ERK майже повністю пригнічена в пухлинах, але не в нормальній тканині. Зроблено висновок, що активність ERK не пов'язана з проліферативними процесами в пухлинній тканині щитоподібної залози. Розглянуто можливі механізми пригнічення активності мітогенного сигнального каскаду в пухлинах щитоподібної залози.

Ключові слова: щитоподібна залоза, доброякісні та злоякісні пухлини, позаклітинна сигнал-регульована кіназа-1/2.

Проліферативний потенціал ракових клітин — один з найважливіших факторів розвитку пухлини. Для діагностики раку щитоподібної залози (ЩЗ) необхідно розробляти нові підходи, щоб отримати характерні для залози показники проліферації на основі вивчення експресії генів, продукти яких беруть участь у підготовці і здійсненні поділу клітин.

Прогноз щодо агресивності пухлин ЩЗ залежить від наявності метастазів. Для знаходження маркерів, необхідних для раннього виявлення карцином ЩЗ з метастазами, були проведені дослідження, які показали, що у метастазуючих пухлинах рівень ядерного антигену проліферуючих клітин (PCNA), який є одним з показників проліферативного потенціалу клітини, вищий, ніж у неметастазуючих [1]. Тому важливо було дослідити мітогенний

© Б. Б. Гуда, В. М. Пушкар'юв, О. В. Журавель, А. Є. Коваленко, В. В. Пушкар'юв, Ю. М. Таращенко, Л. Ю. Зурнаджи, О. І. Ковзун, М. Д. Тронько, 2016

каскад Ret/Ras/Raf/MEK/ERK (МАРК-каскад), який пов'язує сигнали факторів росту на рецепторах клітинної поверхні з транскрипційними факторами, які регулюють експресію генів, що контролюють такі важливі клітинні процеси, як ангиогенез, апоптоз, ріст і проліферацію клітин [2]. Цей сигнальний шлях часто активований в деяких пухлинах у результаті хромосомних транслокацій *RET*-PTC, мутацій *BRAF* (*BRAFV600E*), *RAS*, деяких рецепторів цитокінів або надмірної експресії нормальних і мутованих рецепторів, таких як EGFR [3, 4]. В основі патогенезу раку ЩЗ також лежить неконтрольована активність різних сигнальних шляхів, насамперед МАРК-каскаду [5]. Пригнічення цього каскаду специфічними інгібіторами посилює чутливість ракових клітин (у тому числі і раку ЩЗ) до хіміотерапії [6, 7].

За мету дослідження ставилося порівняння експресії ERK1/2 в нормальних тканинах та доброякісних і злоякісних пухлинах ЩЗ людини.

Дослідження проводилися на післяопераційному матеріалі хворих, одержаному в хірургічному відділенні ДУ “Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України”. Всі пацієнти перед оперативним втручанням підписали інформовану згоду на застосування сучасних методів діагностики та дослідження. Одразу ж після видалення тканину ЩЗ поміщали на лід і швидко заморожували при -80°C . Тканину гомогенізували в гомогенізаторі TissueLyser II фірми “Retsch” (Німеччина) у спеціальному буфері з набору для імуноферментного аналізу ab176660, що містив суміш інгібіторів протеаз та фосфатаз, для збереження інтактності та активності білків.

Для визначення кількості та активації ERK1/2 використовували набори для імуноферментного аналізу ab176660 (“Abscam”, Велика Британія). Дані набори дають можливість одночасно визначати як кількість ERK1/2 (загальна ERK1/2), так і кількість її фосфорильованої по залишках Thr202/Tyr204 форми в кожному зразку тканини. Дослідження проводили в триплетах. Концентрацію білка в лізаті визначали за допомогою наборів на основі біцинхонінової кислоти (BCA protein assay kit) фірми “Novagen” (США). Планшети з ERK1/2 зчитували на рідері фірми “Bio-tek Instruments” (США).

Одержані дані опрацьовані статистично з використанням *t*-критерію Стьюдента і наведені у вигляді $M \pm SD$. Вірогідними вважали відміни при $P < 0,05$.

Як було показано нами раніше, рівень експресії PCNA — показника проліферативного потенціалу клітини, в пухлинній тканині фолікулярної аденоми та папілярної карциноми був вищим, ніж у нормальній тканині [1]. Слід також зазначити, що співвідношення вмісту PCNA між пухлинною та нормальною тканинами в пухлинах з метастазами було значно вищим, ніж в інкапсульованих пухлинах. Отже, вміст PCNA в пухлинних тканинах може служити діагностичним і прогностичним маркером для оцінки агресивності пухлини. Тому було важливо дослідити активність каскаду Ret/Ras/Raf/MEK/ERK, який розглядається як основний сигнальний шлях, що контролює поділ клітин [8], і встановити, як вміст PCNA корелює з експресією і активністю головної ефекторної протеїнкінази цього сигнального шляху — ERK1/2.

Для досліджень був вибраний набір для імуноферментного аналізу ab176660, який дає можливість визначати в кожному зразку тканини одночасно і загальну кількість протеїнкінази і її активацію.

З рис. 1, *a* видно, що у всіх типах пухлин ЩЗ, крім зоба, вміст ERK1/2 у пухлинній тканині був значно нижчим, ніж у нормальній. Особливо велика різниця між нормою та пухлиною спостерігалася в інкапсульованих пухлинах папілярної карциноми та при фолікулярній карциномі (відповідно в 14 та 30 разів). Рівень експресії ERK в багатовузловому

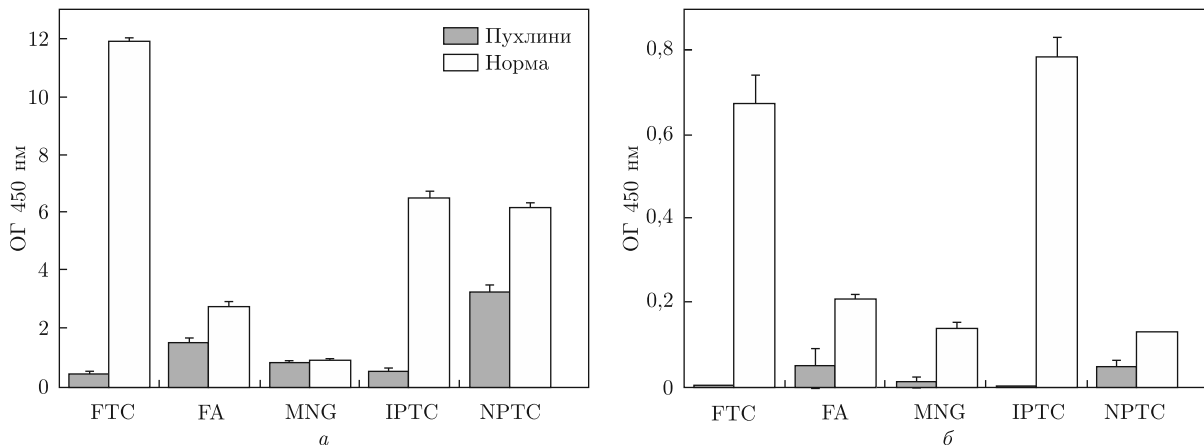


Рис. 1. Експресія (а) та активація (б) ERK1/2 у різних типах пухлин щитоподібної залози. Визначали кількість ERK1/2 (а) та фосфорилування (активація) залишків Thr202/Тур204 (б). FTC — фолікулярна карцинома, FA — фолікулярна аденома, IPTC — папілярна карцинома (інкапсульовані пухлини), NPTC — папілярна карцинома (неінкапсульовані, метастазуючі пухлини), MNG — багатовузловий зоб. $M \pm SD$, $n = 3 \div 6$; * — відміни між умовно нормальною та пухлинною тканинами вірогідні, $P < 0,05$

зобі був нижчим, ніж в інших тканинах і не спостерігалось жодної різниці між нормальною і зобною тканинами (див. рис. 1, а).

Ще більш несподіваним виявився стан активації ERK в цих тканинах. Рівень активності протеїнкінази в пухлинних тканинах був практично на рівні нуля і виявився істотно нижчим від її активності у нормальній тканині (див. рис. 1, б). Як і у випадку експресії ферменту, найбільша різниця між пухлинною та нормальною тканинами спостерігалася в інкапсульованих пухлинах папілярної карциноми та фолікулярної карциноми.

Таким чином, експресія PCNA не корелює з кількістю і активацією ERK1/2. Більше того, виникає протиріччя між проліферативними функціями ERK і низьким рівнем її активації та експресії в пухлинах ЩЗ.

Напевне, найбільш вірогідне пояснення цих розбіжностей надав J. I. Park зі співавт. [9, 10]. Було показано, що, хоча онкогени Ras і Raf часто беруть участь у злоякісній трансформації клітин, у багатьох випадках конститутивна активація цього каскаду в пухлинних тканинах призводить до зупинки росту і сенесценції [9, 10]. Так, у клітинах медулярної карциноми ЩЗ людини активовані Ras чи c-Raf-1 індукують зупинку росту шляхом синтезу і секреції аутокринно-паракринного чинника (лейкемічний інгібіторний фактор (LIF)) [10]. Тривала активація каскаду Raf/MEK/ERK індукує зупинку поділу клітин з відповідними змінами регуляторів клітинного циклу (дефосфорилування і, відповідно, інактивація пухлинного супресора pRb, пригнічення транскрипційного фактора E2F1 і зростання кількості інгібітора циклу — p21^{CIP1}) і специфічними змінами морфології та експресії транскрипційного фактора проліферації c-Myc чи рецепторної тирозинкінази RET у пухлинних клітинах ліній LNCaP, U251 та TT (медулярна карцинома ЩЗ людини) [11].

Тому цілком можливо, що ракова клітина ініціює спеціальні захисні механізми, як, наприклад, збільшення експресії білка теплового шоку морталіну [12], який пригнічує експресію та активацію ERK і, таким чином, захищає себе від сенесценції, зупинки клітинного циклу і апоптозу.

Цитована література

1. *Guda B. B., Pushkarev V. V., Zhuravel O. V. et al.* Експресія ядерного антигену проліферуючих клітин (PCNA) у нормальних тканинах, доброякісних та високодиференційованих злоякісних (з наявністю метастатичного ураження та без метастазів) пухлинах щитоподібної залози людини // Доп. НАН України. – 2015. – № 10. – С. 94–98.
2. *Beeram M., Patnaik A., Rowinsky E. K.* Raf: a strategic target for therapeutic development against cancer // *J. Clin. Oncol.* – 2005. – **23**. – P. 6771–6790.
3. *McCubrey J. A., Steelman L. S., Chappell W. H. et al.* Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2007. – **1773**, No 8. – P. 1263–1284.
4. *Caronia L. M., Phay J. E., Shah M. H.* Role of BRAF in thyroid oncogenesis // *Clin. Cancer Res.* – 2011. – **17**, No 24. – P. 7511–7517.
5. *Xing M.* Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer // *Nat. Rev. Cancer.* – 2013. – **13**. – P. 184–199.
6. *Montagut C., Settleman J.* Targeting the RAF-MEK-ERK pathway in cancer therapy // *Cancer Lett.* – 2009. – **283**, No 2. – P. 125–134.
7. *Milosevic Z., Pesic M., Stankovic T. et al.* Targeting RAS-MAPK-ERK and PI3K-AKT-mTOR signal transduction pathways to chemosensitize anaplastic thyroid carcinoma // *Transl. Res.* – 2014. – **164**, No 5. – P. 411–423.
8. *Wortzel I., Seger R.* The ERK cascade: distinct functions within various subcellular organelles // *Genes & Cancer.* – 2011. – **2**, No 3. – P. 195–209.
9. *Park J. I., Strock C. J., Ball D. W., Nelkin B. D.* The Ras/Raf/MEK/Extracellular signal-regulated kinase pathway induces autocrine-paracrine growth inhibition via the leukemia inhibitory factor/JAK/STAT pathway // *Mol. Cell. Biol.* – 2003. – **23**, No 2. – P. 543–554.
10. *Park J. I.* Growth arrest signaling of the Raf/MEK/ERK pathway in cancer // *Front. Biol. (Beijing).* – 2014. – **9**, No 2. – P. 95–103.
11. *Hong S. K., Yoon S., Moelling C. et al.* Noncatalytic function of ERK1/2 can promote Raf/MEK/ERK-mediated growth arrest signaling // *J. Biol. Chem.* – 2009. – **284**, No 48. – P. 33006–33018.
12. *Wu P. K., Hong S. K., Veeranki S. et al.* A Mortalin/HSPA9-mediated switch in tumor-suppressive signaling of Raf/MEK/Extracellular signal-regulated kinase // *Mol. Cell. Biol.* – 2013. – **33**, No 20. – P. 4051–4067.

References

1. *Guda B. B., Pushkarev V. V., Zhuravel O. V. et al.* Dop. NAN Ukraine, 2015, No 10: 94–98 (in Ukrainian).
2. *Beeram M., Patnaik A., Rowinsky E. K.* *J. Clin. Oncol.*, 2005, **23**: 6771–6790.
3. *McCubrey J. A., Steelman L. S., Chappell W. H. et al.* *Biochim. Biophys. Acta*, 2007, **1773**, No 8: 1263–1284.
4. *Caronia L. M., Phay J. E., Shah M. H.* *Clin. Cancer Res.*, 2011, **17**, No 24: 7511–7517.
5. *Xing M.* *Nat. Rev. Cancer*, 2013, **13**: 184–199.
6. *Montagut C., Settleman J.* *Cancer Lett.*, 2009, **283**, No 2: 125–134.
7. *Milosevic Z., Pesic M., Stankovic T. et al.* *Transl. Res.*, 2014, **164**, No 5: 411–423.
8. *Wortzel I., Seger R.* *Genes & Cancer*, 2011, **2**, No 3: 195–209.
9. *Park J. I., Strock C. J., Ball D. W., Nelkin B. D.* *Mol. Cell. Biol.*, 2003, **23**, No 2: 543–554.
10. *Park J. I.* *Front. Biol. (Beijing)*, 2014, **9**, No 2: 95–103.
11. *Hong S. K., Yoon S., Moelling C. et al.* *J. Biol. Chem.*, 2009, **284**, No 48: 33006–33018.
12. *Wu P. K., Hong S. K., Veeranki S. et al.* *Mol. Cell. Biol.*, 2013, **33**, No 20: 4051–4067.

Надійшло до редакції 06.07.2015

Б. Б. Гуда, В. М. Пушкарев, Е. В. Журавель, А. Е. Коваленко,
В. В. Пушкарев, Ю. Н. Тарашченко, Л. Ю. Зурнаджи, Е. И. Ковзун,
член-корреспондент НАН Украины Н. Д. Тронько

ГУ “Институт эндокринологии и обмена веществ им. В.П. Комисаренко НАМН Украины”,
Киев

E-mail: pushkarev.vm@gmail.com

Экспрессия и активность внеклеточной сигнал-регулируемой киназы-1/2 (ERK1/2) в нормальных тканях и опухолях щитовидной железы человека

Изучены экспрессия и активация главной эффекторной киназы митогенного каскада — внеклеточной сигнал-регулируемой киназы-1/2 (ERK1/2) в нормальных тканях, доброкачественных и злокачественных опухолях щитовидной железы человека. Показано, что общее содержание ERK во всех исследованных опухолях, кроме зоба, значительно ниже в опухолевой ткани по сравнению с нормальными тканями. Активность ERK почти полностью подавлена в опухолях, но не в нормальной ткани. Сделан вывод, что активность ERK не связана с пролиферативными процессами в опухолевой ткани щитовидной железы. Рассмотрены возможные механизмы подавления активности митогенного сигнального каскада в опухолях щитовидной железы.

Ключевые слова: щитовидная железа, доброкачественные и злокачественные опухоли, внеклеточная сигнал-регулируемая киназа-1/2.

**B. B. Guda, V. M. Pushkarev, O. V. Zhuravel, A. Ye. Kovalenko,
V. V. Pushkarev, Y. M. Tarashchenko, L. Y. Zurnadzy, O. I. Kovzun,
Corresponding Member of the NAS of Ukraine M. D. Tronko**

V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of the NAMS of Ukraine, Kiev

E-mail: pushkarev.vm@gmail.com

Expression and activity of extracellular signal-regulated kinase-1/2 (ERK1/2) in normal tissues and human thyroid tumors

We studied the expression and the activation of a main effector kinase of the mitogenic cascade — extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK 1/2) — in normal tissues, benign and malignant human thyroid tumors. The total content of ERK in all investigated tumors except for goiter was significantly lower in tumor tissues compared with normal tissues. ERK activity was almost completely inhibited in tumors, but not in normal tissue. Thus, ERK activity is not associated with proliferative processes in a tumor tissue of a thyroid gland. Possible mechanisms of inhibiting the activity of the mitogenic signaling cascade in thyroid tumors are discussed.

Keywords: thyroid, benign and malignant tumors, extracellular signal-regulated kinase-1/2.