

УДК 577.

**КОНСТИТУТИВНАЯ ЭКСПРЕССИЯ NRAS  
С ДРАЙВЕРНОЙ МУТАЦИЕЙ Q61R АКТИВИРУЕТ ПРОЦЕССЫ  
ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНОГО ПЕРЕХОДА И ВЫЗЫВАЕТ  
СУЩЕСТВЕННОЕ ИЗМЕНЕНИЕ ТРАНСКРИПТОМА КЛЕТОК  
ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ Nthy-ori 3-1<sup>\*,\*\*</sup>**

© 2019 Д.Э. Демин<sup>1,2</sup>, М.А. Афанасьева<sup>1</sup>, А.Н. Уварова<sup>1</sup>, М.М. Прокофьева<sup>1</sup>,  
А.М. Горбачева<sup>1</sup>, А.С. Устюгова<sup>1</sup>, А.В. Клепикова<sup>3,4</sup>, Л.В. Путляева<sup>1</sup>,  
К.А. Татосян<sup>1</sup>, П.В. Белоусов<sup>1</sup>, А.М. Шварц<sup>1,2\*\*\*</sup>

<sup>1</sup> Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,  
119991 Москва, Россия; электронная почта: shvarec@yandex.ru

<sup>2</sup> Московский физико-технический институт, 141701 Москва, Россия

<sup>3</sup> Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН,  
127051 Москва, Россия

<sup>4</sup> Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,  
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
Москва, Россия

Поступила в редакцию 10.10.2018

После доработки 04.12.2018

Принята к публикации 04.12.2018

Мутация Q61R гена *NRAS* является одной из самых распространенных драйверных мутаций рака щитовидной железы (РЩЖ). Для опухолей с данной мутацией характерна инвазия в кровеносные сосуды и образование отдаленных метастазов. Для исследования генов, экспрессия которых изменяется при появлении данной мутации в клетках РЩЖ, была создана модельная система на основе клеточной линии эпителиальных клеток щитовидной железы Nthy-ori 3-1, трансдуцированных лентивирусным вектором, содержащим ген *NRAS* с мутацией Q61R. Показано, что экспрессия *NRAS*<sup>Q61R</sup> в клетках щитовидной железы оказывает значимое влияние на группы генов, задействованных в образовании межклеточных контактов, а также вовлеченных в процессы эпителиально-мезенхимального перехода и клеточной инвазии. Изменение экспрессии этих генов отражается на фенотипе модельных клеток, которые приобретают черты мезенхимальных и демонстрируют способность к выживанию и росту в отсутствие прикрепления к субстрату. Ключевыми регуляторами данных процессов являются транскрипционные факторы семейств SNAIL, ZEB и TWIST. В данной модельной системе изменение фенотипа коррелирует с повышением экспрессии факторов SNAIL2 и TWIST2, что указывает на их возможную роль в регуляции инвазивного роста РЩЖ с мутацией *NRAS*(Q61R).

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** рак щитовидной железы, эпителиально-мезенхимальный переход, *NRAS*<sup>Q61R</sup>, SNAIL, TWIST.

**DOI:** 10.1134/S0320972519040092

Мутации генов семейства *RAS* (*NRAS*, *KRAS* и *HRAS*) являются одними из самых часто встречающихся драйверных мутаций в опухолях человека. Они обнаруживаются в 20–25% всех человеческих опухолей [1]. Гены данного семейства

кодируют малые ГТФазы, передающие сигнал от рецепторов факторов роста на сигнальные пути RAS-RAF-МЕК-ERK и PI3K-AKT-mTOR. Онкогенные мутации нарушают способность данных белков гидролизовать ГТФ, что приводит к их конститутивной активации. Распространенность разных мутаций генов этого семейства сильно варьирует в зависимости от типа рака. В образцах рака щитовидной железы (РЩЖ) среди генов данного семейства в основном обнаруживаются мутации в гене *NRAS* (5–10% от общего числа опухолей). Среди мутаций данного гена чаще всего (77% случаев)

\* Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) и на сайте издательства Springer (Link.springer.com), том 84, вып. 4, 2019.

\*\* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», ВМ 18-285, 04.02.2019.

\*\*\* Адресат для корреспонденции.

встречается мутация *NRAS*(Q61R), приводящая к замене 61 аминокислоты глутамин на аргинин в белке *NRAS* [2]. У пациентов, в биоптате узлов щитовидной железы которых обнаруживались клетки с мутацией этого гена, вероятность злокачественного характера опухоли составляет 74–88% [3]. Мутация Q61R гена *NRAS* чаще всего встречается в образцах фолликулярного типа рака щитовидной железы и фолликулярного варианта папиллярного рака [4]. Для опухолей с мутацией данного гена характерна инвазия в кровеносные сосуды и образование отдаленных метастазов [5]. В ряде исследований было показано, что мутации *NRAS* встречаются в отдаленных метастазах чаще, чем в первичных опухолях [6, 7].

Важными этапами активации инвазивного роста опухолевых клеток является эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) и повышение способности клеток к субстрат-независимому росту [8, 9]. Для клеток, реализующих данный тип трансформации, характерно повышение экспрессии ряда ключевых регуляторов данного процесса – транскрипционных факторов семейств *SNAI1*, *ZEB* и *TWIST* [10, 11]. Транскрипционные факторы трех указанных выше семейств регулируют экспрессию ряда генов, отвечающих за морфологию клеток и образование межклеточных контактов [11]. Так, в процессе ЭМП наблюдается повышение уровней виментина (*VIM*), фибронектина (*FN1*) и *N*-кадгерина (*CDH2*), а также снижение уровня *E*-кадгерина (*CDH1*) и окклюдина (*OCLN*) [12, 13]. Важно отметить, что вклад каждого отдельного транскрипционного фактора в реализацию данного процесса в разных опухолях может сильно различаться [11], и в настоящее время роль конкретных факторов, участвующих в регуляции ЭМП в опухолях щитовидной железы с мутацией *NRAS*(Q61R), изучена слабо. Ранее было показано, что в высокодифференцированных опухолях щитовидной железы инвазивный рост характерен в основном для периферических клеток, и исследование этого процесса на данных, полученных для полной опухоли, затруднительно [14].

Для исследования процессов, вызываемых появлением мутации Q61R гена *NRAS* в клетках РЩЖ, была создана модельная система на основе клеточной линии фолликулярных эпителиальных клеток щитовидной железы Nthy-ori 3-1, трансдуцированных лентивирусным вектором, экспрессирующим соответствующий онкоген. Линия Nthy-ori 3-1 получена из нормальных первичных клеток, immortalized большим антигеном вируса SV40 [15], и не несет драйверных мутаций, что позволяет наиболее полно оценить биологические эффекты мутации *NRAS*(Q61R).

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Клонирование лентивирусных векторов, содержащих кодирующую последовательность гена *NRAS* дикого типа и последовательность с мутацией *NRAS*(Q61R).** Для клонирования гена *NRAS* с мутацией Q61R использовали коммерчески доступную плазмиду pBabeN-Ras-61K («Addgene», США) [16], содержащую кодирующую последовательность гена *NRAS* человека с мутацией Q61K. Для получения последовательности с мутацией *NRAS*(Q61R) с помощью двухступенчатой ПЦР выполняли сайт-направленный мутагенез 182A>G в 61 кодоне исходной последовательности. Аналогичным образом получали полноразмерную кодирующую последовательность гена *NRAS* дикого типа, вводя в последовательность гена *NRAS* с мутацией Q61K двойную замену 181A>C/182A>G. В обоих случаях в последовательность вводили сайты рестрикции *Bam*HI (5'-конец) и *Not*I (3'-конец) для клонирования в лентивирусный вектор. (Последовательности использованных праймеров приведены в Table S1 Приложения.) В качестве лентивирусного вектора была использована плаزمид LeGO-iPuro2 («Lentiviral Gene Ontology Vectors», Германия), содержащая ген устойчивости к пуромицину.

**Введение линии клеток щитовидной железы и ее трансдукция лентивирусными векторами.** Клеточную линию immortalized клеток эпителия щитовидной железы Nthy-ori 3-1 («Sigma», США) выращивали в среде RPMI1640 («ПанЭко», Россия) с добавлением 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки («Biosera», Франция), L-глутамин (2 мМ), пенициллина и стрептомицина, и пирувата натрия (1 мМ) («Thermo Fisher Scientific», США). На основе данной линии были получены три деривата, трансдуцированные тремя разными вариантами лентивирусных векторов: исходным вектором LeGO-iPuro2, векторами iPuro2-*NRAS*(WT) и iPuro2-*NRAS*(Q61R), несущими разные варианты кодирующей последовательности гена *NRAS* человека. Вирусные частицы были получены как описано в статье [17]. Через 48 ч после добавления вирусных частиц проводили селекцию на пуромицине (конечная концентрация 1 мкг/мл) в течение 14 дней. Встраивание целевых генов дополнительно подтверждали с помощью ПЦР в реальном времени с использованием праймеров, специфичных для мРНК лентивирусного вектора (PURO-F/R, Table S1 Приложения). Данные приведены на рис. S1 Приложения. Изменение суммарного уровня мРНК гена *NRAS* во всех полученных дериватах линии Nthy-ori 3-1 измеряли с помощью ПЦР в реальном времени с использова-

нием праймеров NRAS-F/R (Table S1 Приложения).

**Выделение РНК, синтез кДНК и количественный ПЦР в реальном времени.** Суммарная РНК была выделена из различных дериватов клеток Nthy-ori 3-1 с использованием реагента Extract-RNA («Евроген», Россия) согласно инструкции производителя. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием 2 мкг тотальной РНК с помощью набора MMLV RT Kit («Евроген») согласно протоколу производителя. Количественный ПЦР анализ проводили как описано в статье [18]. Последовательности использованных праймеров приведены в соответствующем разделе Table S1 Приложения.

**Вестерн-блот анализ.** Вестерн-блот анализ проводили как описано в статье [19]. Лизаты клеток смешивали в соотношении 3 : 1 с 4 × буфером Лэммли, инкубировали 5 мин при 95 °С и наносили на 10%-ный полиакриламидный гель из расчета 30 мкг белка на лунку. Анализ фосфорилированного варианта белка Erk1/2 проводили с использованием антител Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) («Cell signaling», США) в разведении 1 : 2000 согласно протоколу производителя; в качестве вторичных антител использовали конъюгированные с пероксидазой хрена антитела козы к IgG кролика («Thermo Scientific») в разведении 1 : 30 000. Для анализа содержания тотального Erk1/2 использовали антитела p44/42 MAPK (Erk1/2) («Cell signaling») в разведении 1 : 2000 и вторичные антитела козы к IgG мыши, конъюгированные с пероксидазой («Thermo Scientific») в разведении 1 : 30 000.

**Измерение способности субстрат-независимого роста клеток.** Способность клеток расти без подложки измеряли методом мягкого агара как описано в статье [20]. Для этого на дно 12-луночного планшета наливалась подложка из описанной выше полной среды для ведения клеток Nthy-ori 3-1 с добавлением 0,6%-ной агарозы. После застывания подложки сверху заливали полную среду с 0,3%-ной агарозы, в которую добавляли исследуемые дериваты клеточной линии Nthy-ori 3-1 в количестве 5000 клеток на лунку. Через сутки сверху наливали полную среду без агарозы и меняли ее один раз в 2–3 дня. Через неделю с помощью микроскопа LEICA DM14000B на 100× увеличении проводили подсчет колоний, содержащих более 25 клеток.

**Анализ транскриптома клеток.** Тотальная РНК всех исследуемых дериватов линии Nthy-ori 3-1 была получена как описано выше. Для каждого из дериватов, содержащих лентивирусные вектора с разными вариантами гена *NRAS*, были получены и проанализированы два независимых биологических повтора. Библиотеки кДНК

были получены с использованием набора Bio-scientific NEXTflex Rapid Directional qRNA-Seq Library Prep kit («Bio Scientific Corporation», США) согласно протоколу производителя. Секвенирование библиотек производили с помощью прибора Illumina NextSeq («Illumina», США). Использовали одиночные чтения длиной 75 п.н. Результаты были обработаны с использованием программы CLC Genomics Workbench 8.5.1 при следующих параметрах: показатель качества – 0,005; допуск двух неоднозначно прочитанных нуклеотидов; удаление одного 5'-концевого нуклеотида; удаление одного 3'-концевого нуклеотида; удаление чтений с финальной длиной менее 25 пн. Полученные последовательности были картированы с помощью CLC Genomics Workbench 8.5.1 на референсную последовательность генома *H. sapiens* (GRCh38). При картировании допускалось не более двух несовпадений нуклеотидов чтения с референсом. Уровень экспрессии гена определялся как число чтений, картированных на соответствующий ген. Нормализацию размеров библиотек проводили как описано в статье [18]. Дифференциальную экспрессию генов рассчитывали с использованием пакета «DESeq2» 1.20.0. Под *p*-значениями дифференциальной экспрессии имеют вид поправленные *p*-значения (adjusted *p*-value) из DESeq2. Под корреляцией подразумевается коэффициент линейной корреляции Пирсона. При сравнении экспрессии в модели и опухоли корреляцию рассчитывали по логарифмированным значениям экспрессии. *P*-значения всех корреляций меньше 10<sup>-5</sup>. Для сравнения полученных корреляций использовали преобразование Фишера. Исходные данные секвенирования размещены в NCBI Short Read Archive, номер проекта PRJNA486710.

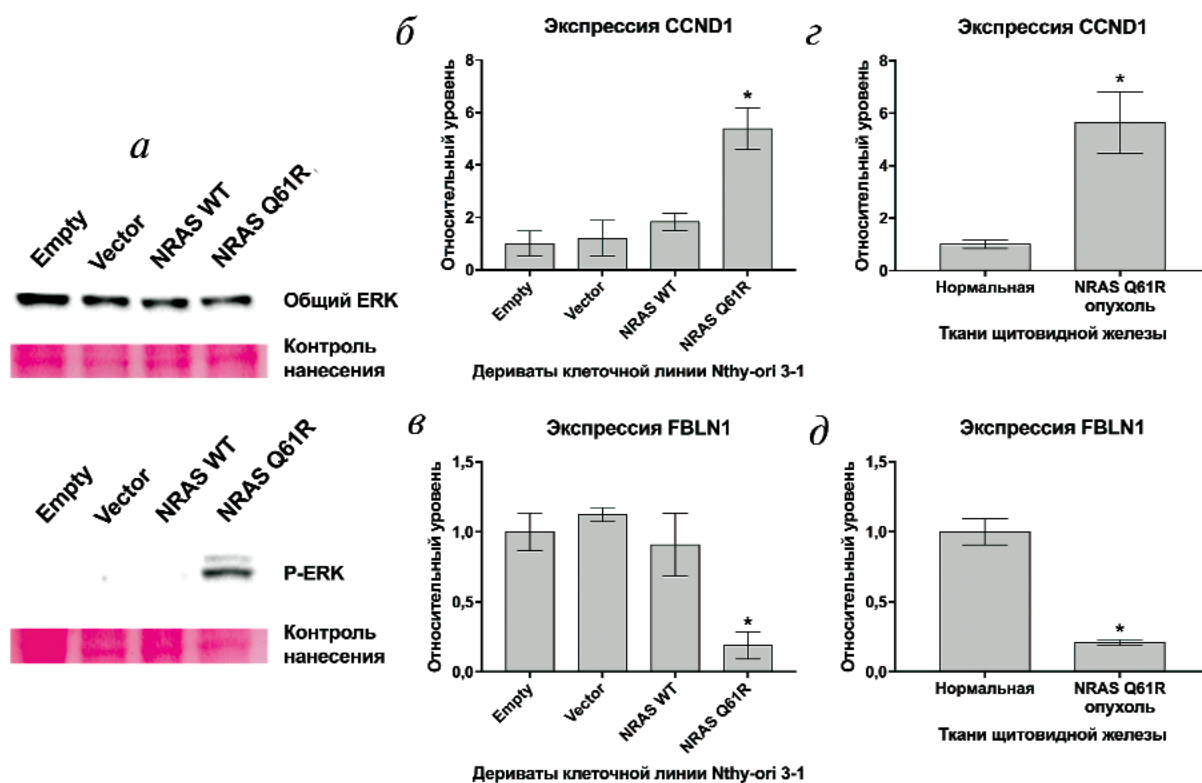
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Экспрессия гена *NRAS* с мутацией Q61R в клетках Nthy-ori 3-1 активирует внутриклеточные сигнальные каскады RAS-RAF-МЕК-ERK и PI3K-AKT-mTOR.** На первом этапе работы произведена оценка влияния конститутивной экспрессии *NRAS*<sup>Q61R</sup> на активацию пути RAS-RAF-МЕК-ERK и PI3K-AKT-mTOR. Одним из ключевых этапов активации сигнального пути RAS-RAF-МЕК-ERK является фосфорилирование киназы Erk1/2 (p44/42 MAPK) [21]. С помощью Вестерн-блот анализа показано, что трансдукция клеток Nthy-ori 3-1 конструкцией, содержащей мутантный вариант гена *NRAS*, действительно приводит к появлению в этих клетках фосфорилированной формы киназы Erk1/2. При этом транс-

дукция клеток исходным лентивирусным вектором и несущим ген *NRAS* дикого типа вектором не влияет на фосфорилирование данной киназы (рис. 1, а). Таким образом, активация MAPK-каскада вызвана именно мутантным белком, а не эффектами, связанными со встраиванием вектора в геном или сверхэкспрессией гена *NRAS*. Помимо данного сигнального каскада *NRAS* активирует сигнальный путь PI3K-АКТ-mTOR. Ранее было показано, что при активации данного каскада происходит повышение экспрессии циклина D1 (*CCND1*) [22]. С помощью метода ПЦР в реальном времени показано, что экспрессия циклина D1 значительно усиливается (более чем в 5 раз) только при трансдукции клеток Nthy-ori 3-1 лентивирусом, содержащим ген *NRAS* с мутацией Q61R (рис. 1, б). С помощью опубликован-

ных результатов транскрипционного анализа образцов РЩЖ [23] было показано, что в опухолях, содержащих данную драйверную мутацию, уровень экспрессии *CCND1* выше, чем в нормальной ткани при в ~4–6 раз (рис. 1, в), что соответствует изменению экспрессии гена в представленной модельной линии.

Увеличение количества матричной РНК определенного гена в суммарной РНК клеточной популяции может свидетельствовать как о повышении экспрессии данного гена во всех клетках, так и о высокой экспрессии гена лишь в небольшой популяции клеток, тогда как резкое снижение экспрессии гена в небольшой группе клеток слабо влияет на средний уровень его экспрессии в популяции. Значимое уменьшение среднего уровня экспрессии определенного гена



**Рис. 1.** Анализ влияния мутантного белка NRAS с мутацией Q61R на клетки Nthy-ori 3-1. *а* – Анализ фосфорилирования белка Erk1/2 (p44/42 MAPK) методом Вестерн-блот. Сверху представлен результат анализа на общий Erk1/2, снизу – на фосфорилированный. В обоих случаях приведен контроль нанесения (окраска мембраны красителем Понсо S). Образец клеток Nthy-ori 3-1, не трансдуцированных лентивирусным вектором, обозначен «Empty», трансдуцированных исходным вектором – «Vector», вектором, несущим кодирующую последовательность гена *NRAS* дикого типа и гена *NRAS* с мутацией Q61R, обозначены соответственно «NRAS WT» и «NRAS Q61R»; *б* и *в* – результаты количественного анализа мРНК генов *CCND1* и *FBLN1* соответственно. Обозначение вариантов клеточной линии Nthy-ori 3-1 такое же, как на рис. *а*. Данные нормированы на результаты, полученные для исходных клеток Nthy-ori 3-1. Указаны средние значения по четырем независимым экспериментам ± SEM. \* – Достоверное отличие от результатов, полученных для нетрансдуцированных клеток, «Empty» (*p*-значение < 0,001 по критерию Стьюдента); *г* и *д* – относительная экспрессия генов *CCND1* и *FBLN1* в нормальной ткани ЩЖ и опухолях ЩЖ, несущих мутацию *NRAS*(Q61R). Данные для расчетов взяты из статьи [28]. Приведены уровни экспрессии, нормированные на средние значения экспрессии соответствующих генов в нормальной ткани ЩЖ. Указаны средние значения для каждого типа опухоли ± SEM. \* – Достоверное отличие от результатов, полученных для нормальной ткани (*p*-значение < 0,001 по критерию Стьюдента).

С цветным вариантом рис. 1 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: [www.elibrary.ru](http://www.elibrary.ru)



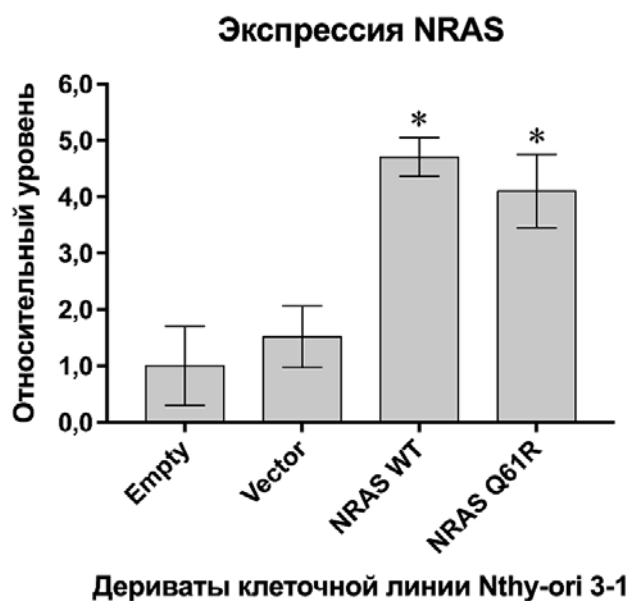
может наблюдаться только при его изменении в значительной части клеток популяции. Таким образом, изменение экспрессии гена, уровень мРНК которого значительно падает, лучше отражает однородность транскрипционных программ популяции клеток. Поэтому дополнительно исследовали уровень мРНК гена фибулина 1 (*FBLN1*), экспрессия которого в опухолях ЩЖ с мутацией Q61R гена *NRAS* снижена в ~5 раз относительно нормальной ткани (по данным анализа данных из статьи [23] (рис. 1, д). Как видно из данных количественного анализа РНК, показанных на рис. 1, е, уровень экспрессии фибулина 1 в клетках Nthy-ori 3-1, трансдуцированных вектором, содержащим мутантный ген *NRAS*, также снижен в ~5 раз относительно исходной линии, что подтверждает однородность транскриптомов полученной популяции клеток.

**Экспрессия онкогена *NRAS*<sup>Q61R</sup> приводит к изменению экспрессии ряда генов, задействованных в образовании межклеточных контактов, регуляции подвижности клеток и ангиогенезе.** Был проведен сравнительный анализ транскриптомов исходных клеток Nthy-ori 3-1 и трех ее дериватов, трансдуцированных «пустым» вирусным вектором, а также векторами, содержащими ген *NRAS* дикого типа и с мутацией Q61R (нормированная экспрессия генов приведена в Table S2 Приложения). Корреляция результатов RNA-Seq, полученных для исходных клеток и клеток, трансдуцированных «пустым» вектором составляет более 0,99, что говорит о низком влиянии трансдукции на уровни экспрессии генов. Корреляция транскриптомных данных, полученных для исходных клеток и клеток, трансдуцированных векторами, содержащими *NRAS* дикого типа и с мутацией Q61R, равна соответственно 0,98 и 0,92. В обоих дериватах со сверхэкспрессией разных вариантов гена *NRAS* наблюдается сходный уровень мРНК гена *NRAS*, в ~4 раза превышающий уровень в нетрансдуцированных клетках и клетках, трансдуцированных «пустым» вектором (рис. 2).

Сравнение транскриптомов этих двух дериватов клеточной линии позволило выявить гены, экспрессия которых меняется только под действием сверхэкспрессии онкогена с исследуемой драйверной мутацией. При сравнении транскриптомов двух дериватов со сверхэкспрессией разных вариантов гена *NRAS* было выявлено ~1200 дифференциально экспрессирующихся генов ( $p$ -значение < 0,05) (Table S3 Приложения). Была проведена функциональная аннотация данного списка генов с помощью ресурса DAVID [24, 25] (Table S4 и 5 Приложения). В результате анализа были получены частично пересекающиеся функциональные кластеры, содер-

жащие такие группы генов, как «Позитивная регуляция миграции клеток эндотелия», «Сигнальный путь фактора роста эндотелия», «Сигнальный путь рецептора внеклеточного матрикса», «Фокальная адгезия», «Межклеточные контакты», «Сигнальный путь фактора роста эндотелия», «Якорные мембранные белки», а также интегрины. Изменения экспрессии генов из данных групп может оказывать непосредственное влияние на агрессивность опухоли. Так, при наличии в клетках исследуемой драйверной мутации растет экспрессия генов *FN1* и *CDH2*, участвующих в миграции клеток РЩЖ [26, 27], а также *VEGFA*, *NRP1* и *NRP2* (Table S3 Приложения), участвующих в стимуляции ангиогенеза [28, 29]. С другой стороны, трансдукция Nthy-ori 3-1 вектором, несущим *NRAS*<sup>Q61R</sup>, приводит к снижению экспрессии *PRKCG* и увеличению экспрессии *NECTIN3* и *WNT5A*. Данные изменения уровней мРНК трех вышеперечисленных генов связаны со снижением способности клеток опухолей к образованию метастазов [30–32].

Также анализ показал обогащение группы генов «Сигнальные пути интерферона I типа» и



**Рис. 2.** Количественный анализ экспрессии гена *NRAS* в полученных дериватах клеточной линии Nthy-ori 3-1. Образец клеток Nthy-ori 3-1, нетрансдуцированных лентивирусным вектором, обозначен как «Empty», трансдуцированных исходным вектором – «Vector», вектором, несущим кодирующую последовательность гена *NRAS* дикого типа и гена *NRAS* с мутацией Q61R, обозначены соответственно «NRAS WT» и «NRAS Q61R». Данные нормированы на уровень экспрессии бетаактина и поделены на экспрессию гена в нетрансдуцированных клетках. Указаны средние значения по четырем независимым экспериментам ± SEM. \* – Достоверное отличие от результатов, полученных для нетрансдуцированных клеток, «Empty» ( $p$ -значение < 0,01 по критерию Стьюдента)

«Защита от вирусов». В ряде работ показано, что сигнальный путь АКТ-mTOR-STAT играет ключевую роль в транскрипционном ответе на интерферон I типа [33, 34]. Однако в нашем эксперименте наблюдали снижение транскрипции ряда генов (таких как *OAS2*, *MX1*), экспрессия которых должна повышаться при активации данного сигнального пути. Согласно нашим данным, при конститутивной экспрессии NRAS<sup>Q61R</sup> повышается уровень STAT-индуцированных STAT-ингибиторов, таких как гены семейства *SOCS* (Table S3 Приложения), что может приводить к подавлению активности сигнального каскада АКТ-mTOR-STAT [35].

Таким образом, экспрессия онкогена NRAS<sup>Q61R</sup> в линии эпителиальных клеток щитовидной железы человека прежде всего приводит к изменению экспрессии ряда генов, участвующих в важных для канцерогенеза процессах роста и миграции клеток. Далее была проведена оценка того, насколько выбранная модельная система отражает изменения транскриптома опухолей с соответствующей драйверной мутацией.

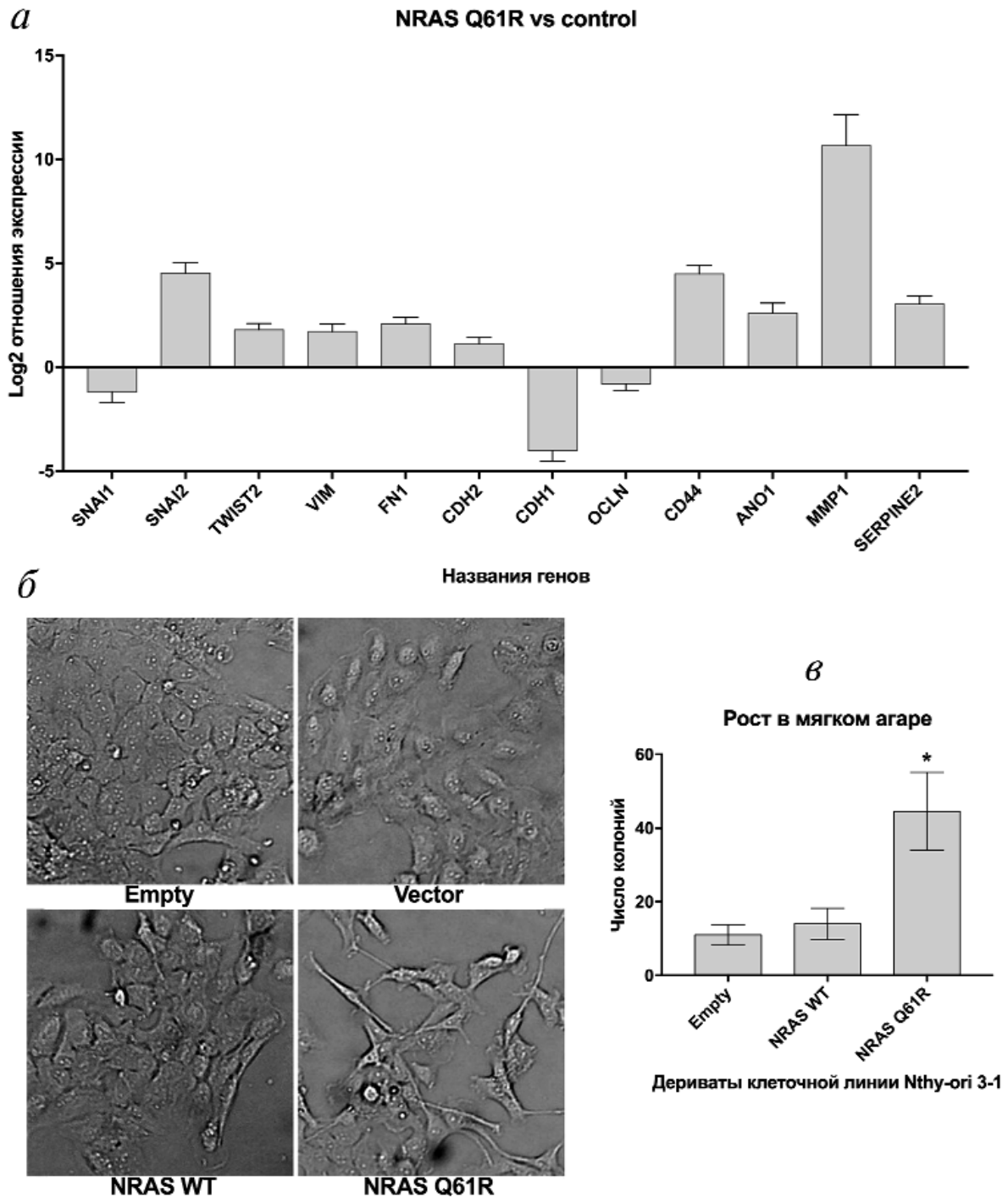
**Профиль экспрессии клеточной линии Nthy-ori 3-1, трансдуцированной вектором, содержащим ген NRAS с мутацией Q61R, схож с профилем экспрессии опухолей щитовидной железы, содержащих данную драйверную мутацию.** Для верификации нашей модели было проведено сравнение ее транскриптома с транскриптомами опухолей, содержащих ту же драйверную мутацию, и опухолей, содержащих другую мутацию, характерную для РЩЖ, *BRAF*(V600E). Для этого мы использовали опубликованные данные транскриптомного анализа 57 образцов нормальной ткани щитовидной железы человека, 28 образцов РЩЖ с мутацией Q61R гена NRAS и 239 образцов опухолей с другой распространенной драйверной мутацией РЩЖ – *BRAF*(V600E) [36]. Для более показательного корреляционного анализа нами были отобраны гены, экспрессия которых наиболее значительно отличается в опухолях и нормальной ткани. Для каждой группы опухолей нами был составлен список из 500 генов с наиболее достоверным (наименьшие *p*-значения) изменением экспрессии относительно нормальной ткани. Корреляция значений экспрессии этих генов в нашей модельной линии с экспрессией в опухолях с мутацией NRAS(Q61R) составила 0,55, а со значениями экспрессии генов в опухолях с мутацией *BRAF*(V600E) – 0,38 (*p*-значение различия корреляций 0,0003), что указывает на большее сходство транскриптома модельной линии с транскриптомами опухолей с той же драйверной мутацией.

**Экспрессия онкогена NRAS<sup>Q61R</sup> влияет на транскрипцию ряда генов, вовлеченных в процессы эпи-**

**телиально-мезенхимального перехода и инвазивного роста, и приводит к изменению морфологии клеток и повышению способности к субстрат-независимому росту.** При анализе транскриптомом исследуемых вариантов клеточных линий было обнаружено, что экспрессия белка NRAS<sup>Q61R</sup> существенно влияет на уровень ряда генов, вовлеченных в регуляцию инвазивного роста клеток. Как было отмечено выше, важными этапами активации инвазивного роста опухолевых клеток являются активация процессов ЭМП и повышение способности клеток к субстрат-независимому росту. Согласно нашим данным, экспрессия в клетках эпителиальной линии щитовидной железы гена NRAS с мутацией Q61R приводит к активации экспрессии *SNAI2* и снижает экспрессию гена *SNAI1*, которые кодируют белки SNAIL2 и SNAIL1 соответственно (рис. 3, а). Также в нашей модельной системе повышается экспрессия гена *TWIST2*. Экспрессия ряда других генов этих семейств (*SNAI3*, *ZEB1*, *ZEB2* и *TWIST1*) значимо не меняется. Как видно из данных экспрессионного профилирования (рис. 3, а), трансдукция клеток Nthy-ori 3-1 вектором, содержащим ген NRAS с мутацией Q61R, приводит к характерному для ЭМП повышению уровня мРНК виментина (VIM), фибронектина (FN1) и N-кадгерина (CDH2), а также к снижению уровня E-кадгерина (CDH1) и окклюдина (OCLN).

Морфологическими признаками ЭМП являются уменьшение числа межклеточных контактов и контактов с субстратом, переход от многоугольной к вытянутой и веретенообразной форме клеток [37]. На фотографиях, представленных на рис. 3, б, видно, что трансдукция клеток вектором с мутантным геном NRAS приводит к изменению морфологии клеток: они приобретают более вытянутую форму и контактируют меньшей поверхностью с другими клетками.

Дополнительно было проанализировано изменение уровня мРНК ряда других генов, вовлеченных в процессы инвазивного роста и метастазирования (рис. 3, а). Анализ показал, что экспрессия гена NRAS с мутацией Q61R приводит к значимому повышению экспрессии генов *CD44* и *ANO1*, кодирующих адгезионный белок и переносчик хлорид-ионов соответственно. Для обоих этих белков показана связь с субстрат-независимым ростом опухолевых клеток и образованием метастазов [38, 39]. Кроме того, экспрессия исследуемого онкогена приводит к повышению уровня экспрессии ряда генов, участвующих в реорганизации межклеточного матрикса (гены *MMP1*, *SERPINE2*) [40]. Способность исследуемых вариантов клеток к субстрат-независимому росту изучали с помощью теста на рост в мягком агаре [9]. Как видно из результатов это-



**Рис. 3.** Анализ признаков эпителиально-мезенхимального перехода у клеток Nthy-ori 3-1 после трансдукции векторами, содержащими ген *NRAS* с мутацией Q61R. На диаграмме *a* – представлены результаты количественного (транскриптомного) анализа генов, вовлеченных в процессы ЭМП и инвазивного роста. Приведенные данные показывают уровень мРНК в клетках, экспрессирующих *NRAS*<sup>Q61R</sup>, нормированный на уровень мРНК соответствующих генов в клетках Nthy-ori 3-1, нетрансдуцированных вектором, содержащим ген *NRAS* (*p*-значение < 0,05 согласно расчетам DESeq2); *б* – приведены микрофотографии (100× увеличение) различных вариантов клеточной линии Nthy-ori 3-1. Образец клеток Nthy-ori 3-1, нетрансдуцированных лентивирусным вектором, обозначен как «Empty», трансдуцированных исходным вектором «Vector», вектором, несущим кодирующую последовательность гена *NRAS* дикого типа и гена *NRAS* с мутацией Q61R, обозначены соответственно «NRAS WT» и «NRAS Q61R»; *в* – результаты теста на способность роста клеток в мягком агаре. Данные нормированы на результаты, полученные для клеток Nthy-ori 3-1 нетрансдуцированных лентивирусным вектором. Указаны средние значения по четырем независимым экспериментам ± SEM. \* – Достоверное отличие от результатов полученных для нетрансдуцированных клеток, «Empty» (*p*-значение < 0,001 по критерию Стьюдента)



го теста (рис. 3, в), наибольшей способностью к такому типу роста обладают клетки, экспрессирующие мутантную форму NRAS. Таким образом, экспрессия мутантного варианта гена NRAS в клетках Nthy-ori 3-1 приводит к изменениям в транскрипции ряда генов, вовлеченных в процессы инвазивного роста, причем эти изменения находят свое отражение в фенотипе данных клеток.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Несмотря на то, что большинство драйверных мутаций генов семейства RAS в целом функционально схожи, разные мутации в различных типах эпителиальной ткани могут в большей или меньшей степени активировать те или иные элементы сигнальных каскадов. Исследования, проводимые на различных модельных клеточных линиях, позволяют оценить разветвленность путей реализации онкогенных процессов, что может быть важно для подбора терапевтических мишеней. Так, ранее сообщалось, что активация ЭМП в клетках с драйверной мутацией гена данного семейства HRAS(V12) может происходить за счет угнетения экспрессии белка p63, и подавление его экспрессии само по себе может быть достаточно для изменения фенотипа клеток [41]. В другой статье сообщалось, что для активации ЭМП в клетках со сверхэкспрессией гена HRAS необходима высокая экспрессия гена LTB4R2 [42]. Однако в используемой нами в данной работе линии Nthy-ori 3-1 уровень экспрессии соответствующих генов TP63 и LTB4R2 (Table S3 Приложения) находится на фоновом уровне во всех дериватах, что не мешает клеткам демонстрировать изменение фенотипа в ответ на экспрессию онкогена NRAS<sup>Q61R</sup>. Также было показано, что в клетках меланомы и рака легкого с драйверными мутациями генов RAS и RAF важную роль в развитии ЭМП играет повышение экспрессии транскрипционного фактора SNAI1 [43, 44]. Однако, согласно нашим данным, экспрессия NRAS<sup>Q61R</sup> приводит к значимому понижению уровня мРНК данного фактора (рис. 3, а). Отличие регуляции процесса ЭМП в нашей модели и других экспериментальных системах может объясняться типом ткани и конкретной драйверной мутацией, однако совместно эти данные демонстрируют разветвленную регуляторную систему, которая требует комплексного подхода для блокировки.

В организме клетки опухоли взаимодействуют с другими клетками, которые могут существенно влиять на раковые клетки как за счет сигнальных молекул, так и за счет иммунного ре-

дактирования [45]. Все это может приводить к тому, что влияние драйверной мутации на фенотип опухолевой клетки может быть изменено под действием внешних факторов. В связи с этим интересным представляется изучение тех генов, экспрессия которых меняется в модельных клеточных линиях, но практически не меняется или меняется в противоположную сторону в реальных опухолях с соответствующей драйверной мутацией. Так, при анализе данных экспрессионного анализа образцов РЦЖ [36] мы установили, что экспрессия ряда генов, вовлеченных в процессы ЭМП и клеточной инвазии (SNAI2, TWIST2, VIM и ANO1), а также некоторых генов провоспалительных цитокинов и факторов ангиогенеза (VEGFA, CXCL1, CXCL8, IL1B и IL6) в опухолях с мутацией NRAS(Q61R) в среднем почти такая же или ниже, чем в нормальной ткани, тогда как в клеточной линии Nthy-ori 3-1, содержащей ген NRAS с мутацией Q61R, уровень экспрессии этих генов существенно повышается (рис. 4). Стоит отметить, что для образцов РЦЖ с данной мутацией вообще не выявлено повышение экспрессии факторов семейств SNAI, ZEB и TWIST (рис. 4), что хорошо соотносится с тем фактом, что для таких опухолей характерно наличие фенотипа, близкого к фенотипу нормальной ткани. Однако подавление экспрессии генов VEGFA и SNAI2 в

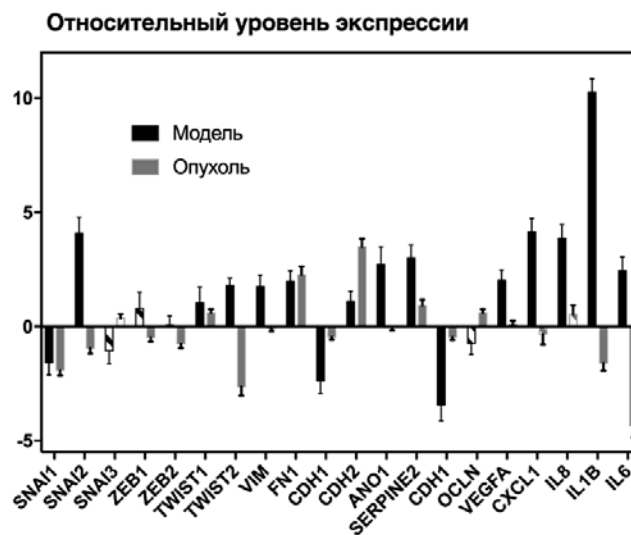


Рис. 4. Относительный уровень экспрессии генов, участвующих в процессах ЭМП, ангиогенеза и инвазивного роста клеток. Отношение экспрессии гена в клетках Nthy-ori 3-1, трансдуцированных вектором, несущим ген NRAS с мутацией Q61R, и в исходных клетках указано черным «Модель», отношение экспрессии гена в опухолях с той же мутацией и нормальной ткани указано серым «Опухоль». Недостоверные изменения (в модели  $p$ -значение  $> 0,05$ , в опухоли  $p$ -значение  $> 0,001$  согласно расчетам DESeq2) выделены пунктирным заполнением



клетках РЩЖ приводило к нарушению образования метастазов [46, 47], и высокая экспрессия цитокинов CXCL1, CXCL8 и IL1B в клетках РЩЖ также положительно коррелирует с частотой образования метастазов [48, 49]. Это позволяет предположить, что в большинстве клеток опухолей щитовидной железы с мутацией NRAS(Q61R) экспрессия этих генов подавлена, а повышение экспрессии этих генов под действием данной драйверной мутации происходит только в периферических клетках опухоли и при образовании метастазов. Это предположение частично подтверждается данными о том, что экспрессии некоторых генов, задействованных в ЭМП (VIM и RUNX2), в периферической части образцов РЩЖ существенно выше, чем в центральной [20].

Таким образом, клеточная линия, экспрессирующая ген NRAS с мутацией Q61R, может быть полезной моделью РЩЖ с данной драйверной мутацией. Наша модель может служить для изучения наиболее подвижных и мигрирую-

щих клеток опухоли, которые являются важной мишенью терапии.

### Финансирование

Работа была поддержана грантом РФФИ (проект 16-15-10423). В рамках выполнения данного проекта проведены получение модельных дериватов клеточных линий, анализ уровня фосфорилирования белка Erk1/2 и экспрессии генов в полученных дериватах.

Биоинформатический анализ ранее опубликованных данных о экспрессии генов в опухолях щитовидной железы и нормальной ткани поддержано Программой фундаментальных исследований государственных академий наук на 2013–2020 гг. (тема 01201363817).

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Goodsell, D.S. (1999) The molecular perspective: the *Ras* oncogene, *Oncologist*, **4**, 263–264.
2. Fukushima, T., and Takenoshita, S. (2005) Roles of RAS and BRAF mutations in thyroid carcinogenesis, *Fukushima J. Med. Sci.*, **51**, 67–75.
3. Bhajjee, F., and Nikiforov, Y.E. (2011) Molecular analysis of thyroid tumors, *Endocrinol. Pathol.*, **22**, 126–133, doi: 10.1007/s12022-011-9170-y.
4. Nikiforov, Y.E., and Nikiforova, M.N. (2011) Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer, *Nat. Rev. Endocrinol.*, **7**, 569–580, doi: 10.1038/nrendo.2011.142.
5. Jang, E.K., Song, D.E., Sim, S.Y., Kwon, H., Choi, Y.M., Jeon, M.J., Han, J.M., Kim, W.G., Kim, T.Y., Shong, Y.K., and Kim, W.B. (2014) NRAS codon 61 mutation is associated with distant metastasis in patients with follicular thyroid carcinoma, *Thyroid*, **24**, 1275–1281, doi: 10.1089/thy.2014.0053.
6. Melo, M., Gaspar da Rocha, A., Batista, R., Vinagre, J., Martins, M.J., Costa, G., Ribeiro, C., Carrilho, F., Leite, V., Lobo, C., Cameselle-Teijeiro, J.M., Cavadas, B., Pereira, L., Sobrinho-Simoes, M., and Soares, P. (2017) TERT, BRAF, and NRAS in primary thyroid cancer and metastatic disease, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **102**, 1898–1907, doi: 10.1210/jc.2016-2785.
7. Sohn, S.Y., Park, W.Y., Shin, H.T., Bae, J.S., Ki, C.S., Oh, Y.L., Kim, S.W., and Chung, J.H. (2016) Highly concordant key genetic alterations in primary tumors and matched distant metastases in differentiated thyroid cancer, *Thyroid*, **26**, 672–682, doi: 10.1089/thy.2015.0527.
8. Gras, B., Jacquerd, L., Wierinckx, A., Lamblot, C., Fauvet, F., Lachuer, J., Puisieux, A., and Anisau, S. (2014) Snail family members unequally trigger EMT and thereby differ in their ability to promote the neoplastic transformation of mammary epithelial cells, *PLoS One*, **9**, e92254, doi: 10.1371/journal.pone.0092254.
9. Cifone, M.A., and Fidler, I.J. (1980) Correlation of patterns of anchorage-independent growth with *in vivo* behavior of cells from a murine fibrosarcoma, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 1039–1043.
10. Brabletz, T., Kalluri, R., Nieto, M.A., and Weinberg, R.A. (2018) EMT in cancer, *Nat. Rev. Cancer*, **18**, 128–134, doi: 10.1038/nrc.2017.118.
11. Puisieux, A., Brabletz, T., and Caramel, J. (2014) Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors, *Nat. Cell. Biol.*, **16**, 488–494, doi: 10.1038/ncb2976.
12. Cano, A., Perez-Moreno, M.A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M.J., del Barrio, M.G., Portillo, F., and Nieto, M.A. (2000) The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression, *Nat. Cell. Biol.*, **2**, 76–83, doi: 10.1038/35000025.
13. Vu, T., and Datta, P.K. (2017) Regulation of EMT in colorectal cancer: a culprit in metastasis, *Cancers (Basel)*, **9**, doi: 10.3390/cancers9120171.
14. Vasko, V., Espinosa, A.V., Scouten, W., He, H., Auer, H., Liyanarachchi, S., Larin, A., Savchenko, V., Francis, G.L., de la Chapelle, A., Saji, M., and Ringel, M.D. (2007) Gene expression and functional evidence of epithelial-to-mesenchymal transition in papillary thyroid carcinoma invasion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 2803–2808, doi: 10.1073/pnas.0610733104.
15. Lemoine, N.R., Mayall, E.S., Jones, T., Sheer, D., McDermid, S., Kendall-Taylor, P., and Wynford-Thomas, D. (1989) Characterization of human thyroid epithelial cells immortalized *in vitro* by simian virus 40 DNA transfection, *Br. J. Cancer*, **60**, 897–903.
16. Khosravi-Far, R., White, M.A., Westwick, J.K., Solski, P.A., Chrzanowska-Wodnicka, M., Van Aelst, L., Wigler, M.H., and Der, C.J. (1996) Oncogenic *Ras* activation of Raf/mitogen-activated protein kinase-independent pathways is sufficient to cause tumorigenic transformation, *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 3923–3933.
17. Prokofjeva, M.M., Proshkina, G.M., Lebedev, T.D., Shulgin, A.A., Spirin, P.V., Prassolov, V.S., and Deyev, S.M. (2017) Lentiviral gene delivery to plasmolipin-expressing

- cells using *Mus caroli* endogenous retrovirus envelope protein, *Biochimie*, **142**, 226–233, doi: 10.1016/j.biochi.2017.09.004.
18. Schwartz, A.M., Putlyaeva, L.V., Covich, M., Klepikova, A.V., Akulich, K.A., Vorontsov, I.E., Korneev, K.V., Dmitriev, S.E., Polanovsky, O.L., Sidorenko, S.P., Kulakovskiy, I.V., and Kuprash, D.V. (2016) Early B-cell factor 1 (EBF1) is critical for transcriptional control of SLAMF1 gene in human B cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **1859**, 1259–1268, doi: 10.1016/j.bbagr.2016.07.004.
  19. Afanasyeva, M.A., Britanova, L.V., Korneev, K.V., Mitkin, N.A., Kuchmiy, A.A., and Kuprash, D.V. (2014) Clusterin is a potential lymphotoxin beta receptor target that is upregulated and accumulates in germinal centers of mouse spleen during immune response, *PLoS One*, **9**, e98349, doi: 10.1371/journal.pone.0098349.
  20. Kim, B.A., Jee, H.G., Yi, J.W., Kim, S.J., Chai, Y.J., Choi, J.Y., and Lee, K.E. (2017) expression profiling of a human thyroid cell line stably expressing the BRAFV600E mutation, *Cancer Genomics Proteomics*, **14**, 53–67, doi: 10.21873/cgp.20018.
  21. Roskoski, R. Jr. (2012) ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation, *Pharmacol. Res.*, **66**, 105–143, doi: 10.1016/j.phrs.2012.04.005.
  22. Pauta, M., Rotllan, N., Fernandez-Hernando, A., Langhi, C., Ribera, J., Lu, M., Boix, L., Bruix, J., Jimenez, W., Suarez, Y., Ford, D.A., Baldan, A., Birnbaum, M.J., Morales-Ruiz, M., and Fernandez-Hernando, C. (2016) Akt-mediated foxo1 inhibition is required for liver regeneration, *Hepatology*, **63**, 1660–1674, doi: 10.1002/hep.28286.
  23. Giordano, T.J., Kuick, R., Thomas, D.G., Misek, D.E., Vinco, M., Sanders, D., Zhu, Z., Ciampi, R., Roh, M., Shedden, K., Gauger, P., Doherty, G., Thompson, N.W., Hanash, S., Koenig, R.J., and Nikiforov, Y.E. (2005) Molecular classification of papillary thyroid carcinoma: distinct BRAF, RAS, and RET/PTC mutation-specific gene expression profiles discovered by DNA microarray analysis, *Oncogene*, **24**, 6646–6656, doi: 10.1038/sj.onc.1208822.
  24. Huang da W., Sherman B.T., and Lempicki R.A. (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources, *Nat. Protoc.*, **4**, 44–57, doi: 10.1038/nprot.2008.211.
  25. Huang da W., Sherman, B.T., and Lempicki, R.A. (2009) Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists, *Nucleic Acids Res.*, **37**, 1–13, doi: 10.1093/nar/gkn923.
  26. Sponziello, M., Rosignolo, F., Celano, M., Maggisano, V., Pece, V., De Rose, R.F., Lombardo, G.E., Durante, C., Filetti, S., Damante, G., Russo, D., and Bulotta, S. (2016) Fibronectin-1 expression is increased in aggressive thyroid cancer and favors the migration and invasion of cancer cells, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **431**, 123–132, doi: 10.1016/j.mce.2016.05.007.
  27. Da, C., Wu, K., Yue, C., Bai, P., Wang, R., Wang, G., Zhao, M., Lv, Y., and Hou, P. (2017) N-cadherin promotes thyroid tumorigenesis through modulating major signaling pathways, *Oncotarget*, **8**, 8131–8142, doi: 10.18632/oncotarget.14101.
  28. Peng, X.G., Chen, Z.F., Zhang, K.J., Wang, P.G., Liu, Z.M., Chen, Z.J., Hou, G.Y., and Niu, M. (2015) VEGF Trapon inhibits tumor growth in papillary thyroid carcinoma, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, **19**, 235–240.
  29. Kawakami, T., Tokunaga, T., Hatanaka, H., Kijima, H., Yamazaki, H., Abe, Y., Osamura, Y., Inoue, H., Ueyama, Y., and Nakamura, M. (2002) Neuropilin 1 and neuropilin 2 co-expression is significantly correlated with increased vascularity and poor prognosis in nonsmall cell lung carcinoma, *Cancer*, **95**, 2196–2201, doi: 10.1002/cncr.10936.
  30. Dowling, C.M., Hayes, S.L., Phelan, J.J., Cathcart, M.C., Finn, S.P., Mehigan, B., McCormick, P., Coffey, J.C., O'Sullivan, J., and Kiely, P.A. (2017) Expression of protein kinase C gamma promotes cell migration in colon cancer, *Oncotarget*, **8**, 72096–72107, doi: 10.18632/oncotarget.18916.
  31. Martin, T.A., Lane, J., Harrison, G.M., and Jiang, W.G. (2013) The expression of the Nectin complex in human breast cancer and the role of Nectin-3 in the control of tight junctions during metastasis, *PLoS One*, **8**, e82696, doi: 10.1371/journal.pone.0082696.
  32. Kremenevskaja, N., von Wasielewski, R., Rao, A.S., Schofl, C., Andersson, T., and Brabant, G. (2005) Wnt-5a has tumor suppressor activity in thyroid carcinoma, *Oncogene*, **24**, 2144–2154, doi: 10.1038/sj.onc.1208370.
  33. Kaur, S., Kroczyńska, B., Sharma, B., Sassano, A., Arslan, A.D., Majchrzak-Kita, B., Stein, B.L., McMahon, B., Altman, J.K., Su, B., Calogero, R.A., Fish, E.N., and Plataniias, L.C. (2014) Critical roles for Rictor/Sin1 complexes in interferon-dependent gene transcription and generation of anti-proliferative responses, *J. Biol. Chem.*, **289**, 6581–6591, doi: 10.1074/jbc.M113.537852.
  34. Kaur, S., Sassano, A., Majchrzak-Kita, B., Baker, D.P., Su, B., Fish, E.N., and Plataniias, L.C. (2012) Regulatory effects of mTORC2 complexes in type I IFN signaling and in the generation of IFN responses, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 7723–7728, doi: 10.1073/pnas.1118122109.
  35. Cooney, R.N. (2002) Suppressors of cytokine signaling (SOCS): inhibitors of the JAK/STAT pathway, *Shock*, **17**, 83–90.
  36. Cancer Genome Atlas Research Network (2014) Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma, *Cell*, **159**, 676–690, doi: 10.1016/j.cell.2014.09.050.
  37. Thiery, J.P., and Sleeman, J.P. (2006) Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **7**, 131–142, doi: 10.1038/nrm1835.
  38. Mueller, N., Wicklein, D., Eisenwort, G., Jawhar, M., Berger, D., Stefanzi, G., Greiner, G., Boehm, A., Kornauth, C., Muellauer, L., Sehner, S., Hoermann, G., Sperr, W.R., Staber, P.B., Jaeger, U., Zuber, J., Arock, M., Schumacher, U., Reiter, A., and Valent, P. (2018) CD44 is a RAS/STAT5-regulated invasion receptor that triggers disease expansion in advanced mastocytosis, *Blood*, doi: 10.1182/blood-2018-02-833582.
  39. Jia, L., Liu, W., Guan, L., Lu, M., and Wang, K. (2015) Inhibition of calcium-activated chloride channel ANO1/TMEM16A suppresses tumor growth and invasion in human lung cancer, *PLoS One*, **10**, e0136584, doi: 10.1371/journal.pone.0136584.
  40. Drak Alsibai, K., and Meseure, D. (2018) Tumor microenvironment and noncoding RNAs as co-drivers of epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis, *Dev. Dyn.*, **247**, 405–431, doi: 10.1002/dvdy.24548.
  41. Yoh, K.E., Regunath, K., Guzman, A., Lee, S.M., Pfister, N.T., Akanni, O., Kaufman, L.J., Prives, C., and Prywes, R. (2016) Repression of p63 and induction of EMT by mutant Ras in mammary epithelial cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 6107–6116, doi: 10.1073/pnas.1613417113.
  42. Kim, H., Choi, J.A., and Kim, J.H. (2014) Ras promotes transforming growth factor-beta (TGF-beta)-induced epithelial-mesenchymal transition via a leukotriene B4 receptor-2-linked cascade in mammary epithelial cells, *J. Biol. Chem.*, **289**, 22151–22160, doi: 10.1074/jbc.M114.556126.
  43. Wu, D., Zhao, B., Qi, X., Peng, F., Fu, H., Chi, X., Miao, Q.R., and Shao, S. (2018) Nogo-B receptor promotes epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer cells through the Ras/ERK/Snail1 pathway, *Cancer Lett.*, **418**, 135–146, doi: 10.1016/j.canlet.2018.01.030.

44. Maiques, O., Barcelo, C., Panosa, A., Pijuan, J., Orgaz, J.L., Rodriguez-Hernandez, I., Matas-Nadal, C., Tell, G., Vilella, R., Fabra, A., Puig, S., Sanz-Moreno, V., Matias-Guiu, X., Canti, C., Herrerros, J., Marti, R.M., and Macia, A. (2018) T-type calcium channels drive migration/invasion in BRAFV600E melanoma cells through Snail1, *Pigment Cell. Melanoma Res.*, **31**, 484–495, doi: 10.1111/pcmr.12690.
45. Mittal, D., Gubin, M.M., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. (2014) New insights into cancer immunoediting and its three component phases – elimination, equilibrium and escape, *Curr. Opin. Immunol.*, **27**, 16–25, doi: 10.1016/j.coi.2014.01.004.
46. Wang, R., Ma, Q., Ji, L., Yao, Y., Ma, M., and Wen, Q. (2018) MiR-622 suppresses tumor formation by directly targeting VEGFA in papillary thyroid carcinoma, *Oncotargets Ther.*, **11**, 1501–1509, doi: 10.2147/OTT.S156810.
47. Sheng, L., Zhang, S., and Xu, H. (2017) Effect of slug-mediated down-regulation of E-cadherin on invasiveness and metastasis of anaplastic thyroid cancer cells, *Med. Sci. Monit.*, **23**, 138–143.
48. Borrello, M.G., Alberti, L., Fischer, A., Degl'innocenti, D., Ferrario, C., Gariboldi, M., Marchesi, F., Allavena, P., Greco, A., Collini, P., Pilotti, S., Cassinelli, G., Bressan, P., Fugazzola, L., Mantovani, A., and Pierotti, M.A. (2005) Induction of a proinflammatory program in normal human thymocytes by the RET/PTC1 oncogene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 14825–14830, doi: 10.1073/pnas.0503039102.
49. Meng, X., Kong, D.H., Li, N., Zong, Z.H., Liu, B.Q., Du, Z.X., Guan, Y., Cao, L., and Wang, H.Q. (2014) Knockdown of BAG3 induces epithelial-mesenchymal transition in thyroid cancer cells through ZEB1 activation, *Cell Death Dis.*, **5**, e1092, doi: 10.1038/cddis.2014.32.

**CONSTITUTIVE EXPRESSION OF *NRAS*  
WITH Q61R DRIVER MUTATION ACTIVATES THE PROCESSES  
OF EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION AND LEADS  
TO SUBSTANTIAL TRANSCRIPTOME CHANGE  
OF Nthy-ori 3-1 THYROID EPITHELIAL CELLS**

**D. E. Demin<sup>1,2</sup>, M. A. Afanasyeva<sup>1</sup>, A. N. Uvarova<sup>1</sup>,  
M. M. Prokofjeva<sup>1</sup>, A. M. Gorbachova<sup>1</sup>, A. S. Ustiugova<sup>1</sup>,  
A. V. Klepikova<sup>3,4</sup>, L. V. Putlyaeva<sup>1</sup>, K. A. Tatosyan<sup>1</sup>,  
P. V. Belousov<sup>1</sup>, and A. M. Schwartz<sup>1,2\*</sup>**

<sup>1</sup> Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia; E-mail: shvarec@yandex.ru

<sup>2</sup> Moscow Institute of Physics and Technology, 141701 Moscow, Russia

<sup>3</sup> Institute for Information Transmission Problems, Russian Academy of Sciences, 127051 Moscow, Russia

<sup>4</sup> Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

Received October 10, 2018

Revised December 4, 2018

Accepted December 4, 2018

Q61R mutation of *NRAS* gene is one of the most frequent driver mutations of thyroid cancer. The tumors with this mutation are characterized by invasion into blood vessels and formation of distant metastases. To study the role of this mutation in thyroid cancer, we developed a model system on the basis of thyroid epithelial cell line Nthy-ori 3-1 transduced by lentiviral vector containing *NRAS* gene with Q61R mutation. It was shown that the expression of *NRAS*<sup>Q61R</sup> in thyroid epithelial cells has a profound influence on groups of genes involved in the formation of intercellular contacts, as well as in the processes of epithelial-mesenchymal transition and cell invasion. The alteration in expression of these genes affects phenotype of the model cells that acquire the traits of mesenchymal cells and demonstrate increased ability for survival and growth without attachment to a substrate. The key regulators of these processes are transcription factors belonging to families SNAIL, ZEB and TWIST, and in different types of tumors the contribution of each individual factor can vary greatly. In our model system, phenotype changes correlate with an increase in the expression of SNAIL2 and TWIST2 factors, which indicates their possible role in regulating invasive growth of the thyroid cancer with the mutation of *NRAS* (Q61R).

**Keywords:** thyroid cancer, invasive growth, epithelial-mesenchymal transition, *NRAS*<sup>Q61R</sup>, SNAIL, TWIST