

УДК 577.218

СНИЖЕНИЕ УРОВНЯ мРНК ГЕНА *PTPN11* ПРЕПЯТСТВУЕТ ИЗМЕНЕНИЮ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ КЛЕТОЧНЫЙ ЦИКЛ, УСТОЙЧИВОСТЬ К ХИМИОТЕРАПИИ И ОНКОГЕН-ИНДУЦИРУЕМОЕ КЛЕТОЧНОЕ СТАРЕНИЕ, В ОТВЕТ НА ЭКСПРЕССИЮ ОНКОГЕНА BRAF V600E В КЛЕТКАХ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА^{*,**}

© 2020 Л.В. Путляева^{1,2}, Д.Э. Демин^{1,3}, А.Н. Уварова^{1,4}, Л.С. Зиневич⁵, М.М. Прокофьева¹, Г.Р. Газизова⁶, Е.И. Шагимарданова⁶, А.М. Шварц^{1***}

¹ Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, 119991 Москва, Россия; электронная почта: shvarec@yandex.ru

² Центр наук о жизни, Сколковский институт науки и технологий, 121205 Москва, Россия

³ Московский физико-технический институт, 141701 Долгопрудный, Россия

⁴ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119234 Москва, Россия

⁵ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334 Москва, Россия

⁶ Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский федеральный университет, 420008 Казань, Россия

Поступила в редакцию 21.09.2019

После доработки 21.09.2019

Принята к публикации 20.10.2019

Сигнальный путь MAPK (RAS/BRAF/MEK/ERK) представляет собой киназный каскад, участвующий в регуляции клеточной пролиферации, дифференцировки и выживаемости в ответ на внешние стимулы. В различных опухолях обнаруживается мутация V600E гена *BRAF*, приводящая к 500× усилению киназной активности BRAF. Однако монотерапия селективными ингибиторами BRAF V600E часто приводит к реактивации сигнального каскада MAPK и возникновению резистентности к ингибитору, поэтому разрабатываются новые мишени для дополнительного ингибирования компонентов aberrантно активированного каскада. Недавно было обнаружено, что резистентность к ингибиторам онкогена BRAF V600E может быть связана с активностью тирозинфосфатазы SHP-2, кодируемой геном *PTPN11*. В данной работе мы проанализировали влияние подавления транскрипции *PTPN11* на экспрессию генов, задействованных в регуляции пролиферации, устойчивости к химиотерапии и онкоген-индуцируемого старения (ОИС) клеток, в условиях селективного подавления BRAF V600E на модели фолликулярного эпителия щитовидной железы. Было показано, что подавление экспрессии *PTPN11* с помощью малых интерферирующих РНК действительно предотвращает повышение экспрессии генов *CCNA1* и *NOTCH4*, участвующих в формировании лекарственной устойчивости опухолей, в ответ на действие вемурафениба. С другой стороны, подавление экспрессии *PTPN11* блокирует активацию транскрипции ряда генов, участвующих в регуляции клеточного цикла и вовлеченных в процесс ОИС: *p21*, *p15*, *p16*, *RB1* и *IGFBP7*, в ответ на экспрессию онкогена BRAF V600E. Таким образом, можно предположить, что фосфатаза SHP-2 может участвовать не только в формировании лекарственной устойчивости опухолевых клеток, но и в развитие процесса ОИС клетки.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: SHP-2, BRAF V600E, опухоли щитовидной железы, онкоген-индуцируемое старение.

DOI: 10.31857/S0320972520010108

Принятые сокращения: EGFR – рецептор эпидермального фактора роста, ОИС – онкоген-индуцируемое старение, ЩЖ – щитовидная железа, РВ-ПЦР – ПЦР в реальном времени.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», ВМ19-271, 02.12.2019.

** Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) и на сайте издательства Springer (<https://link.springer.com/journal/10541>), том 85, вып. 1, 2020.

*** Адресат для корреспонденции.

Аберрантная активация сигнального пути RAS/RAF/MEK/ERK (MAPK-каскад) способствует выживанию и метастазированию клеток и является часто встречающимся механизмом возникновения и прогрессии рака [1]. Одной из наиболее часто встречающихся драйверных мутаций, затрагивающих компоненты данного каскада, является мутация BRAF V600E, встречающаяся во многих типах рака, в частности, рака щитовидной железы (ЩЖ) [2]. В клетках, содержащих белок BRAF V600E, повышены уровни хромосомной нестабильности и митотической активности, а также способность к инвазии за счет MEK-зависимого увеличения экспрессии матричных металлопротеиназ (например, MMP-3, MMP-9 и MMP-13). BRAF V600E-содержащие опухоли имеют более агрессивный характер [3] и ассоциируются с плохим ответом на терапию радиоактивным йодом и с повышенной смертностью пациентов [4]. Учитывая все вышеописанные данные, в последние годы BRAF V600E стал основной терапевтической мишенью в этих видах рака.

SHP-2, кодируемая геном *PTPN11*, была первой протеинфосфатазой, идентифицированной как онкоген [5–7]. Она экспрессируется в различных типах клеток и участвует в онкогенных процессах при лейкемии, раке груди и легкого, регулируя процессы инвазии, метастазирования, апоптоза, онкоген-индуцированного старения (ОИС), повреждения ДНК, пролиферации клеток, прогрессии клеточного цикла и лекарственной устойчивости [8, 9]. Активность SHP-2, как полагают, играет важную роль в активации белков семейства Ras [10, 11], JAK/STAT, PI3K/Akt и других компонентов сигнальных каскадов [12].

Инактивация гена *PTPN11* приводит к гибели в эмбриональном периоде и множественным дефектам развития на стадии гастрюляции у различных типов организмов – мышей, мух, червей [13]. Также к физиологическим функциям SHP-2 относится регуляция функционирования сигнального пути инсулина [14], участие в развитии сердца, и центральной нервной системы [15, 16]. В опухолях различной этиологии роль данной фосфатазы различается в зависимости от стадии и локализации опухоли. SHP-2 выполняет роль опухолевого супрессора при раке печени [17] и раке кости/хряща [18] и напротив, является онкогеном при лейкемии, раке легких, груди и меланоме [19]. Активирующие мутации *PTPN11* были обнаружены в пробах, взятых у больных с острым миелоидным лейкозом, раком желудка, глиобластомой и анапластической крупноклеточной лимфомой, что и позволило определить *PTPN11* как протоонкоген [20].

Экспрессия *PTPN11* повышена и у пациентов с опухолями щитовидной железы, она коррелирует с низкой степенью дифференцировки опухолей, высоким уровнем злокачественности и увеличением количества метастазов в лимфатических узлах [21]. В той же мере высокий уровень экспрессии *PTPN11* выявляется в тиреоидных опухолевых клеточных линиях SW579, IHH-4, FTC-133, TPC-1, DRO, TA-K и ML-1 [21]. На мышинной модели легочной аденокарциномы и клеточных моделях рака прямой кишки было показано, что ингибирование SHP-2 может предотвращать реактивацию каскада RAS/RAF/MEK/ERK, опосредованную активацией рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR) [22, 23]. Также известно, что подавление экспрессии *PTPN11* с помощью антисмысловых олигонуклеотидов замедляет рост опухолевых клеток и индуцирует апоптоз в тиреоидной клеточной линии SW579 [21]. В то же время существуют данные и о позитивном, и о негативном влиянии активирующих мутаций *PTPN11* на работу сигнального каскада Ras/MAPK у больных с синдромом Нунана [14]. Существуют данные об отсутствии влияния ингибирования экспрессии *PTPN11* с помощью shRNA на рост и пролиферацию опухолевой клеточной линии A2058, содержащей мутацию BRAF V600E [24].

Недавно было обнаружено, что тирозинфосфатаза SHP-2 часто активирована в образцах меланомы человека и клеточных линиях меланомы. Также было показано, что SHP-2 участвует в активации сигнального каскада RAS/RAF/MAPK в клетках меланомы, экспрессирующих мутантный белок NRAS, и в клетках, экспрессирующих BRAF дикого типа (WT), а нокдаун *PTPN11* приводит к подавлению деления клеток и активации ERK в линиях клеток меланомы человека WM3211 и MeWo [19].

Вемурафениб (PLX4032) является низкомолекулярным ингибитором BRAF V600E и был одобрен Управлением США по санитарному надзору для терапии метастатической меланомы в 2011 году [25]. При терапии меланомы и карциномы щитовидной железы было обнаружено, что вемурафениб индуцирует стимуляцию передачи сигнала через рецепторные тирозиновые киназы (РТК), что может приводить к быстрой реактивации и стимуляции передачи сигнала через EGFR [26, 27]. В свою очередь, тирозинфосфатаза SHP-2 участвует в передаче сигнала от активированных рецепторов EGF к p21^{Ras} (RASA1), к другим сигнальным молекулам, вследствие чего ингибирование SHP-2 может уменьшать реактивацию MAPK-каскада. Согласно некоторым данным, вемурафениб может вызывать активацию SHP-2 и реактивацию

передачи сигнала через MEK-ERK при наличии экспрессии фактора роста гепатоцитов (HGF) в вемурафениб-резистентных клетках [22].

Целью данной работы была оценка влияния подавления транскрипции *PTPN11* на экспрессию генов, задействованных в регуляции пролиферации, устойчивости к химиотерапии и ОИС клеток в условиях селективного подавления BRAF V600E. Для определения групп генов, экспрессия которых меняется наиболее выражено в данном эксперименте, был проведен транскриптомный анализ. На основе данного анализа был выбран ряд генов, задействованных в регуляции клеточного цикла и реализации программы клеточного старения, и для них был произведен анализ экспрессии с помощью количественной ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР). В результате данной работы мы обнаружили, что подавление экспрессии гена *PTPN11* с помощью малых интерферирующих РНК (миРНК, siRNA) снижает влияние экспрессии онкогена BRAF V600E на транскрипцию ряда генов, участвующих в регуляции клеточного цикла. В частности, подавление транскрипции *PTPN11* препятствует повышению экспрессии (в ответ на действие BRAF V600E и/или вемурафениба) генов, вовлеченных в онкоген-индуцированное старение: *RB1*, *p21*, *p15*, *p16* и *IGFBP*. Это позволяет предполагать, что тирозинфосфатаза SHP-2 участвует в индукции ОИС клетки и, возможно, за счет этого выполняет функцию опухолевого супрессора.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клонирование лентивирусных векторов, содержащих кодирующую последовательность гена *BRAF* с мутацией V600E. Для клонирования гена *BRAF*, содержащего онкогенную мутацию V600E, 5'-конец гена *BRAF* вырезали из коммерчески доступной плазмиды pBABE-Puro-BRAF(V600E) («Addgene», США) [28] по сайтам рестрикции BamHI и MunI, а 3'-конец амплифицировали с помощью ПЦР, используя праймеры BRAF-in-Mun-F и BRAF-Not-R (таблица). В качестве вектора использовали коммерчески доступную плазмиду LeGO-iPuro2, содержащую ген устойчивости к пуromицину («Lentiviral Gene Ontology Vectors», Германия). В последовательность плазмиды заранее вводили сайты рестрикции BamHI (5'-конец) и NotI (3'-конец) для клонирования в лентивирусный вектор. Последовательности всех использованных в работе праймеров приведены в таблице.

Работа с клеточной линией и трансдукция лентивирусными векторами. Клеточную линию иммор-

тализованных клеток эпителия ШЖ Nthy-ori 3-1 («Sigma», США) выращивали в среде RPMI1640 («ПанЭко», Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки («Biosera», Франция), L-глутамина (2 мМ), смеси пенициллина (100 Ед/мл), стрептомицина (100 мкг/мл), а также с добавлением пирувата натрия (1 мМ). На основе данной линии были получены 2 клеточных линии — деривата — трансдуцированные двумя разными вариантами лентивирусных векторов: исходным вектором LeGO-iPuro2 и вектором iPuro2-BRAF V600E, несущим драйверную онкогенную мутацию V600E гена *BRAF* человека. Вирусные частицы были получены, как описано в статье Prokofjeva et al. [29]. Селекцию трансдуцированных клеток на пуromицине (финальная концентрация 1 мкг/мл) проводили в течение 7 дней. Изменение транскрипционной программы клетки после встраивания целевых генов дополнительно подтверждали с помощью РВ-ПЦР с использованием праймеров CCND1 F/R, PAPSS2 F/R, FBLN1 F/R, (таблица), а также с помощью анализа данных экспрессионного профилирования.

Подавление экспрессии гена *PTPN11* и селективное подавление BRAF V600E. Для ингибирования BRAF V600E использовали селективный ингибитор — вемурафениб (PLX4032, «Selleck», США) в концентрации 1 мкМ. Подавление гена *PTPN11* в клетках Nthy-ori 3.1 и Nthy-ori 3.1/BRAF V600E проводили с помощью малых интерферирующих РНК, для трансфекции использовали реагент RNAiMAX («Thermo fisher scientific», США) согласно протоколу производителя. В случае совместного использования миРНК добавлялись через 72 ч после добавления вемурафениба. Для нокдауна гена *PTPN11* использовали ранее опубликованные последовательности миРНК и последовательности соответствующих контрольных scRNA [30] (табл. S1 Приложения).

Выделение РНК, синтез кДНК и количественная РВ-ПЦР. Суммарная РНК из клеточных линий Nthy-ori 3-1 и Nthy-ori 3-1/BRAF V600E была выделена с использованием реагента Trizol («Invitrogen», США) согласно инструкции производителя. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием 2 мкг тотальной РНК при помощи набора MMLV RT Kit («Евроген», Россия). Количественный ПЦР анализ проводили, как описано в статье Schwartz et al. [31]. Последовательности праймеров приведены в соответствующем разделе таблицы.

Вестерн-блот анализ. Вестерн-блот анализ проводили, как описано в статье Afanasyeva et al. [32]. Лизаты клеток смешивали в соотношении 3/1 с 4× буфером Лэммли, инкубировали 5 мин

Последовательности использованных в работе праймеров

Название праймера	5'-3' последовательность праймеров	Описание
1	2	3
PTPN11-F PTPN11-R	5'-CGGTGAATGACTTTTGGCGG-3' 5'-GTTCCCTAACACGCATGACGC-3'	праймеры для анализа экспрессии <i>PTPN11</i>
PTPN11siRNA-F PTPN11siRNA-R	5'-GGAGAACGGUUUGAUUCUUTT-3' 5'-AAGAAUCAACCGUUCUCCTCtt-3'	РНК-олигонуклеотиды с двумя дезоксирибонуклеотидами на 3'-конце, используемые для получения siRNA
PTPN11scRNA-F PTPN11scRNA-R	5'-AGUACAGCAAACGAUACGGtt-3' 5'-CCGUAUCGUUUGCUGUACUtt-3'	РНК-олигонуклеотиды с двумя дезоксирибонуклеотидами на 3'-конце, используемые для получения scRNA
βACT-F βACT-R	5'-TGCGTGACATTAAGGAGAAG-3' 5'-GTCAGGCAGCTCGTAGCTCT-3'	праймеры для анализа экспрессии β-актина
GAPDH-F GAPDH-R	5'-CAAGGTCATCCATGACAACCTTTG-3' 5'-GGCCATCCACAGTCTTCTGG-3'	праймеры для анализа экспрессии <i>GAPDH</i>
CCND1-F CCND1-R	5'-GGCGGAGGAGAACAACAG-3' 5'-TGTGAGGCGGTAGTAGGACA-3'	праймеры для анализа экспрессии <i>CCND1</i>
PAPSS2-F PAPSS2-R	5'-TGCACTTTGACACCCTGCT-3' 5'-CAGCGTTCCTCTTTTCTGTGT-3'	праймеры для анализа экспрессии <i>PAPSS2</i>
FBLN1-F FBLN1-R	5'-ATCAGAAGGACTGCTCGCTG-3' 5'-ATGGCAGCACCTCTCACAA-3'	праймеры для анализа экспрессии <i>FBLN1</i>
BRAF-in-Mun-F BRAF-Not-R	5'-TGATGATGAGAGGTCTAATCCCAGAGTG-3' 5'-TTTTGCGGCCGCTCAGTGGACAGGAAACGCACCA-3'	праймеры для клонирования C-конца <i>BRAF(V600E)</i>
P21-F P21-R	5'-ACTCTCAGGGTCGAAAACGG-3' 5'-GATGTAGAGCGGGCCTTTGA-3'	праймеры для анализа экспрессии <i>p21</i>
MAPK3-F MAPK3-R	5'-CACCCCTGGAAGCCATGAGAG-3' 5'-TGGCGGAGTGGATGTACTTG-3'	праймеры для анализа экспрессии MAPK3 (<i>ERK1</i>)
CCNA1-F CCNA1-R	5'-TAGGGCTGCTAACTGCAAATGG-3' 5'-CCGGTGTCTACTTCATACACATCC-3'	праймеры для анализа экспрессии <i>CCNA1</i>
CCND2-F CCND2-R	5'-ATCCGCAAGCATGCTCAGAC-3' 5'-GCTCAGTCAGGGCATCACAA-3'	праймеры для анализа экспрессии <i>CCND2</i>
CCNG2-F CCNG2-R	5'-GCCCAGAACCTCCACAACAG-3' 5'-GGTGCACCTTTGATCACTGG-3'	праймеры для анализа экспрессии <i>CCNG2</i>
CDKN1C-F CDKN1C-R	5'-AAGAGATCAGCGCCTGAGAAG-3' 5'-TGGGCTCTAAATTGGCTCACC-3'	праймеры для анализа экспрессии <i>CDKN1C</i>
Notch4-F Notch4-R	5'-GGAGGAAGAAGAGGGGAGT-3' 5'-CCCTCTGGGTCTGACCACT-3'	праймеры для анализа экспрессии <i>Notch4</i>
CCNC-F CCNC-R	5'-AGTTATTGCCACTGCTACGGT-3' 5'-AGCAGCAGCAATCAATCTTGT-3'	праймеры для анализа экспрессии <i>CCNC</i>
CCNB2-F CCNB2-R	5'-AGTTCCAGTTCAACCCACCAA-3' 5'-TTGCAGAGCAAGGCATCAGA-3'	праймеры для анализа экспрессии <i>CCNB2</i>
DUSP6-F DUSP6-R	5'-ACCTGGAAGGTGGCTTCACT-3' 5'-GCACTATTGGGGTCTCGGTC-3'	праймеры для анализа экспрессии <i>DUSP6</i>
Mek1-F Mek1-R	5'-ATGCCCAAGAAGAAGCCGAC-3' 5'-GCTCTAGCTCCTCCAGCTTC-3'	праймеры для анализа экспрессии <i>Mek1</i>

Окончание таблицы

1	2	3
P15-F P15-R	5'-GGGAAAGAAGGGAAGAGTGTCTCGTT-3' 5'-GCATGCCCTTGTCTCCTCG-3'	праймеры для анализа экспрессии <i>p15</i>
P16-F P16-R	5'-GGGGGCACCAGAGGCAGT-3' 5'-GGTTGTGGCGGGGCGAGTT-3'	праймеры для анализа экспрессии <i>p16</i>
IGFBP7-F IGFBP7-R	5'-GGCATGGAGTGCCTGAAGAG-3' 5'-CTTGCTGACCTGGGTGATGG-3'	праймеры для анализа экспрессии <i>IGFBP7</i>
LeGO-BRAF-F LeGO-BRAF-R	5'-TTCACCGCAGTGCATCAGAA-3' 5'-AAACGCACACCGGCCTTATT-3'	праймеры для анализа экспрессии лентивирусного вектора, содержащего ген <i>BRAF V600E</i>
IL8-F IL8-R	5'-ACCACCGGAAGGAACCATCT-3' 5'-GAATTCTCAGCCCTCTTCAA-3'	праймеры для анализа экспрессии <i>IL8</i>
VEGFA-F VEGFA-R	5'-CTTGCCTTGCTGCTCTACCT-3' 5'-GCAGTAGCTGCGCTGATAGA-3'	праймеры для анализа экспрессии <i>VEGFA</i>
RB1-F RB1-R	5'-GGACCGAGAAGGACCAACTG-3' 5'-CTTCTGGGTCTGGAAGGCTG-3'	праймеры для анализа экспрессии <i>RB1</i>
IL6-F IL6-R	5'-CATCCTCGACGGCATCTCA-3' 5'-CAGGCAAGTCTCCTCATTGAA-3'	праймеры для анализа экспрессии <i>IL6</i>

при 95 °C и вносили в 10%-ный ПААГ 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 были использованы конъюгированные с пероксидазой хрена антитела козы к IgG кролика («Thermo Scientific», США) в разведении 1 : 30 000. Для анализа содержания тотального Erk1/2 использовали антитела p44/42 MAPK (Erk1/2) («Cell signaling», США) в разведении 1 : 2000 и вторичные антитела козы к IgG мыши, конъюгированные с пероксидазой («Thermo Scientific», США) в разведении 1 : 30 000.

Анализ транскриптома клеток. Тотальные РНК клеточных линий Nthy-ori 3-1 и Nthy-ori 3-1/BRAF V600E были получены, как описано выше. Из 400 нг тотальной РНК была выделена мРНК с помощью набора реагентов NebNext PolyA mRNA Isolation Module («New England Biolabs», Англия). Полученная мРНК была фрагментирована (14 мин при 94 °C) в присутствии случайных праймеров. На матрице фрагментов мРНК была произведена обратная транскрипция и синтезирована кДНК. После этого проводили очистку продуктов реакции на магнитных частицах AMPure XP («Beckman Coulter», США). Далее к полученным фрагмен-

там кДНК были лигированы адаптеры, после чего библиотеки были баркодированы, амплифицированы и очищены на магнитных частицах. Все вышеперечисленные этапы были выполнены с помощью набора реагентов NEBNext Ultra II Directional RNA Library preparation kit for Illumina («New England Biolabs», Англия). Концентрацию библиотеки измеряли на флуориметре Qubit 3.0 («Invitrogen», США), качество библиотеки было проверено на Bioanalyser 2100 («Agilent technologies», США). Перед секвенированием количество молекул библиотеки было валидировано с помощью РВ-ПЦР при использовании 2,5× реакционной смеси для РВ с EVA Green («Синтол», Россия) и праймеров для адаптеров Illumina («Евроген», Россия). Далее с учетом эффективной концентрации библиотека была разведена до 2 нМ и смешана в пул в соответствии с ожидаемой глубиной секвенирования. Секвенирование было выполнено на платформе HiSeq 2500 («Illumina», Германия) в режиме одноконцевых чтений длиной 57 п.н. с помощью набора HiSeq SR Cluster Kit v4 cBot и HiSeq SBS Kit V4 50 cycle kit («Illumina», Германия). Исходные данные доступны на ресурсе SRA ncbi.nlm.nih.gov/sra/ (номер проекта PRJNA529086). Результаты были обработаны при помощи программы Trimmomatic для обрезки чтений [33], программы STAR для картирования чтений на референсную последователь-

ность человека (релиз GRCh38) [34] и алгоритма FeatureCounts для подсчета чтений для генов [35]. Вышеописанные расчеты были выполнены с помощью оборудования ЦКП «Геном» http://www.eimb.ru/rus/ckp/ccu_genome_c.php. Число прочтений в каждом образце было нормализовано с помощью алгоритма DESeq2 [36]. Значения корреляции определяли, как линейный коэффициент корреляции Пирсона (r -Пирсона). Для анализа дифференциальной экспрессии были выбраны гены, уровень мРНК которых изменялся в два и более раз. Для расчета обогащения функциональных групп дифференциально экспрессируемыми генами использовали сервис Metascape [37].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспрессия гена *BRAF* с мутацией V600E в клетках Nthy-ori 3-1 активирует внутриклеточные сигнальные каскады RAS-RAF-МЕК-ERK. Для исследования влияния фосфатазы SHP-2 на транскрипционную программу в опухолях щитовидной железы, содержащих онкогенную мутацию BRAF V600E, использовали ранее созданную нами клеточную линию, стабильно экспрессирующую онкоген BRAF V600E. Для ее создания была использована клеточная линия фолликулярного эпителия человека Nthy-ori 3-1, трансдуцированная лентивирусным конструктором LeGO iPuro2-BRAF V600E (см. раздел «Методы исследования»). Экспрессия лентивирусной мРНК, содержащей последовательность исследуемого онкогена, была подтверждена с помощью РВ-ПЦР (рис. 1, а).

Полученную клеточную линию Nthy-ori/BRAF V600E охарактеризовали с помощью анализа экспрессии ключевого эффектора MAPK-киназного каскада и PI3K-AKT сигнального пути, гена циклина D1 (*CCND1*) [38–40], экспрессия которого активирована в BRAF V600E-содержащих опухолях, а также анализа экспрессии 3'-фосфоаденозин-5'-фосфосульфат синтетазы 2 (*PAPSS2*) и фибулина 1 (*FBLN1*), экспрессия которых в опухолях ЩЖ с данной мутацией значительно снижена (по результатам анализа публично доступных данных транскриптомного профилирования [39] (рис. 1, б)). Нами было показано, что экспрессия мутантной формы BRAF V600E приводила к умеренному повышению экспрессии *CCND1* (примерно в 2–2,5 раза по сравнению с нетрансфицированными клетками), и к выраженному снижению экспрессии *PAPSS2* и *FBLN1* (рис. 1, в). Также было произведено измерение количества ключевого элемента MAPK-каскада, белка Erk1/2 (p44/42

MAPK) [41] и его фосфорилированной изоформы – pErk – в клеточных линиях Nthy-ori 3-1 и Nthy-ori 3-1/BRAF V600E и показано, что в клеточной линии, содержащей мутацию V600E, количество фосфорилированного белка Erk (pErk) возрастает (рис. 1, г).

Мы также провели сравнение полученных нами данных транскриптомного анализа клеточных линий Nthy-ori 3-1 и Nthy-ori 3-1/BRAF V600E с аналогичными исследованиями, опубликованными ранее [42]. Корреляция транскриптомных данных, полученных для опубликованного ранее списка генов и созданной нами клеточной линии Nthy-ori/BRAF V600E, равна 0,76, что демонстрирует достаточно высокую степень схожести результатов.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что созданная нами клеточная линия Nthy-ori/BRAF V600E, стабильно экспрессирующая онкоген BRAF V600E, демонстрирует все признаки онкоген-опосредуемого изменения транскрипционной программы клетки.

Подавление экспрессии гена *PTPN11* уменьшает экспрессию генов, участвующих в ОИС и активации сигнальных путей MAPK и PI3K-AKT в клетках, экспрессирующих BRAF V600E. Для сравнения совместного и раздельного использования селективного ингибитора BRAF V600E и подавления экспрессии *PTPN11* на экспрессионный профиль клеток эпителия щитовидной железы, содержащих мутацию BRAF V600E, был произведен нокдаун гена *PTPN11* на клеточных линиях Nthy-ori 3-1 и Nthy-ori 3-1/BRAF V600E с помощью малых интерферирующих РНК. Эффективность подавления экспрессии *PTPN11* была измерена с помощью метода количественной РВ-ПЦР в исследуемых клеточных линиях. Видно, что происходит существенное подавление экспрессии SHP-2 в случае обоих дериватов данной клеточной линии (рис. 2).

Для изучения возможной роли SHP-2 в модуляции ответа исследуемых клеток на вемурафениб мы провели анализ транскриптомов образцов с нормальной и подавленной экспрессией гена *PTPN11*, а также с воздействием вемурафениба и без него (результаты представлены в табл. S1 Приложения). В результате проведенного анализа были получены группы генов, регуляция которых в наибольшей степени менялась при данных воздействиях. В ответ на воздействие вемурафениба в клетках, экспрессирующих онкоген BRAF V600E, можно отметить выраженное изменение уровня мРНК генов, относящихся к группам «внеклеточный матрикс» (группы 1 и 3), «клеточный ответ на воздействие ионов кальция» (группа 4) и «ответ на ксеноби-

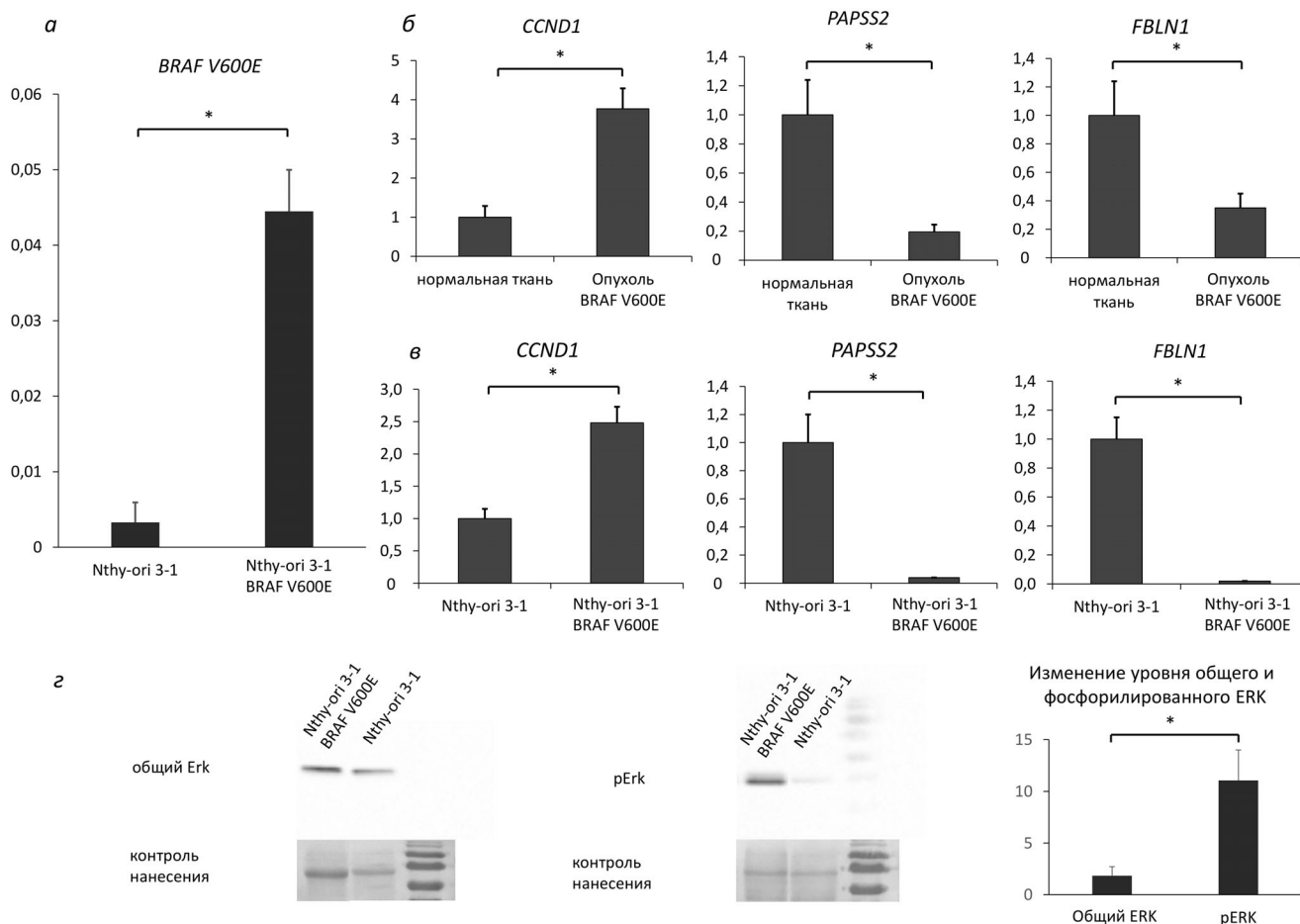


Рис. 1. а – Экспрессия лентивирусной мРНК, кодирующей онкоген BRAF V600E, нормализованная на уровень экспрессии *GAPDH* (ось ординат). По оси абсцисс указаны разные варианты исследуемых клеток, исходные клетки «Nthy-ori-3.1» и «Nthy-ori-3.1 BRAF V600E» клетки, экспрессирующие данный онкоген. Указаны средние значения по 3-м независимым измерениям \pm SEM. * – Достоверные отличия между указанными значениями (p -значение $< 0,05$ по критерию Стьюдента). б – Экспрессионный профиль генов *CCND1*, *PAPS2*, *FBLN1* в нормальной ткани ЩЖ и опухоли ЩЖ, содержащей мутацию BRAF V600E, по данным транскриптомного анализа (GEO dataset ID – GSE27155 [37]). Приведены уровни экспрессии, нормированные на средние значения экспрессии соответствующих генов в нормальной ткани ЩЖ (ось ординат). Указаны средние значения для каждого типа опухоли \pm SEM. * – Достоверные отличия между указанными значениями (p -значение $< 0,05$ по критерию Стьюдента). в – Экспрессионный профиль генов *CCND1*, *PAPS2*, *FBLN1* в нетрансфицированных клетках «Nthy-ori-3.1» и в клетках с гиперэкспрессией исследуемого онкогена «Nthy-ori-3.1 BRAF V600E», по данным РВ-ПЦР (ось ординат). Нормализация на уровень экспрессии *GAPDH* и экспрессию мРНК соответствующего гена в нетрансфицированных клетках Nthy-ori-3.1. Указаны средние значения по 3-м независимым измерениям \pm SEM. * – Достоверные отличия между указанными значениями (p -значение $< 0,05$ по критерию Стьюдента). г – Вестерн-блот анализ фосфорилирования белка Erk1/2 (p44/42 MAPK). Справа показан результат анализа на фосфорилированный Erk1/2, слева – на общий. В обоих случаях приведен контроль нанесения (окраска мембраны красителем Понсо S). На графике указано относительное значение роста общего и фосфорилированного Erk1/2 в клетках, экспрессирующих BRAF V600E, относительно исходных клеток Nthy-ori-3.1. Средние значения по 3-м независимым измерениям \pm SEM. * – Достоверные отличия между указанными значениями (p -значение $< 0,05$ по критерию Стьюдента)

отики первой фазы» (группа 5) (рис. S1 а, в Приложении). Подавление экспрессии гена *PTPN11* приводило к изменению экспрессии генов, относящихся к группам «хронический воспалительный процесс» (группа 2), «клеточный ответ на воздействие кортикостероидов» (группа 3) и «позитивная регуляция секреции IL8» (группа 4) (рис. S1 б, в Приложении). К сожалению, в образце с одновременным действием ве-

мурафениба и коротких интерферирующих РНК к гену *PTPN11* снижение уровня экспрессии последнего было недостаточным, чтобы в полной мере оценить влияние данных воздействий на транскриптом. В связи с этим на основании анализа других образцов был отобран ряд генов, задействованных в процессах клеточного роста, выживания и чувствительности к химиотерапии. Прежде всего, мы обратили внимание

на выраженное влияние подавления экспрессии гена *PTPN11* на экспрессию *IL8*, а также ряда других провоспалительных и ростовых факторов. Изменение уровня мРНК этих генов характерно для клеток, находящихся в состоянии онкоген-индуцированного старения [43]. Кроме того, данное воздействие привело к изменению экспрессии ряда ключевых факторов развития ОИС (*IL8*, *p15*, *p16*, *p21* и *IGFBP7*). Так фактор *p21* способен осуществлять остановку клеточного цикла в двух фазах (*G1* и *G2*) за счет ингибирования циклин-зависимой киназы *1A* [41, 42]. Фактор *p16* оказывает воздействие через сигнальный путь *pRb*, подавляя действие циклин-зависимых киназ, что приводит к остановке клеточного цикла в фазе *G1* [44], а фактор *p15* реализует остановку пролиферации через путь *TGF-β*, его мишенями также являются циклин-зависимые киназы (*CDK4* и *CDK6*) [45]. В свою очередь, для белка *IGFBP7* показана ключевая роль *BRAF* в ингибировании сигнального пути *BRAF-МЕК-ERK* и активации программы ОИС в невусе, содержащем мутацию *V600E* гена *BRAF* [46].

Таким образом, в результате анализа транскриптома было обнаружено изменение экспрессии этих генов, а также других, непосредственно задействованных в регуляции пролиферации и выживания клеток. Верификация изменения экспрессии ряда генов, задействованных в данных процессах, была проведена с помощью количественной РВ-ПЦР в нескольких дополнительных экспериментах (рис. 3).

Согласно полученным данным, экспрессия ряда факторов участвующих в развитии онкоген-индуцируемого старения (*p15*, *p16*, *p21* и *IGFBP7*) повышена в клеточной линии *Nthy-ori 3-1/BRAF V600E* по сравнению с исходными иммортализованными клетками фолликулярного эпителия ЩЖ (линия *Nthy-ori 3-1*) (рис. 3). Также экспрессия онкогена *BRAF V600E* приводит к повышению уровня РНК, кодирующих белки *IL6*, *IL8* и *VEGFA*, повышенная секреция которых характерна для клеток, находящихся в состоянии ОИС [43] (рис. S2 в Приложении). Это говорит в пользу нашего предположения о том, что экспрессия данных генов вызвана наличием в клетке онкогена *BRAF V600E*. Также было показано, что нокдаун гена *PTPN11* значительно уменьшает экспрессию регуляторов ОИС (*RB1*, *P15*, *p16*, *p21* и *IGFBP7*) и генов ОИС-ассоциированного секреторного профиля (*IL6*, *IL8* и *VEGFA*), приближая их экспрессию в клетках *Nthy-ori 3-1/BRAF V600E* к уровню в исходных клетках (рис. 3 и рис. S2 в Приложении). Исходя из этих данных, можно предположить, что тирозинфосфатаза *SHP-2* функцио-

нирует как важный элемент регуляции ОИС. Любопытно, что добавление селективного ингибитора *BRAF V600E* – вемурафениба – само по себе повышает экспрессию генов *p15* и *p16* даже в клетках, не содержащих онкоген, однако этот эффект также пропадает в случае нокдауна *PTPN11* (рис. 3).

Также мы показали, что введение мутации *BRAF V600E* увеличивает экспрессию ряда генов, участвующих в активации сигнальных путей *MAPK* и *P13K-АКТ* при агрессивном фенотипе опухоли: *Notch4* [44], *MAPK3 (ERK1)*, *MEK1*, а также многих представителей семейства циклинов (гены *CCNB2*, *CCNC* и *CCNA1*). Также было отмечено увеличение экспрессии негативного регулятора гиперактивации *BRAF – DUSP6* [45, 46]. Стоит отметить, что для вышеперечисленных генов использование вемурафениба зачастую усиливало эффект введения онкогена *BRAF V600E*, который затем нивелировался при подавлении *PTPN11* (гены *Notch4*, *CCNA1*, *DUSP6* и др.). Известно, что гены *Notch4* и *CCNA1* участвуют в развитии лекарственной устойчивости при лечении рака груди [47] и рака яичников [48]. Также известно, что при повышении уровня экспрессии *CCNA1* повышается

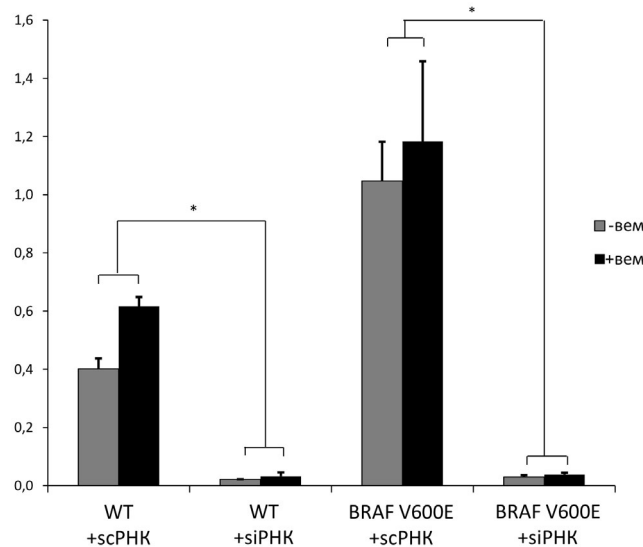


Рис. 2. Подавление экспрессии гена *PTPN11* с помощью малых интерферирующих РНК в нетрансфицированных клетках «WT» и в клетках с гиперэкспрессией исследуемого онкогена «BRAF V600E», подвергнутых обработке вемурафениба (+vem) и без обработки. Клетки, обработанные мРНК к гену *PTPN11*, обозначены «SI»; клетки, обработанные контрольными РНК, обозначены «SC». Приведен относительный уровень экспрессии гена, нормализованного на экспрессию гена *GAPDH* (ось ординат). Указаны средние значения по двум независимым экспериментам ± SEM. * – Достоверное отличие от образца, трансфицированного контрольными (scrambled) scPHK (*p*-значение < 0,05 по критерию Стьюдента)

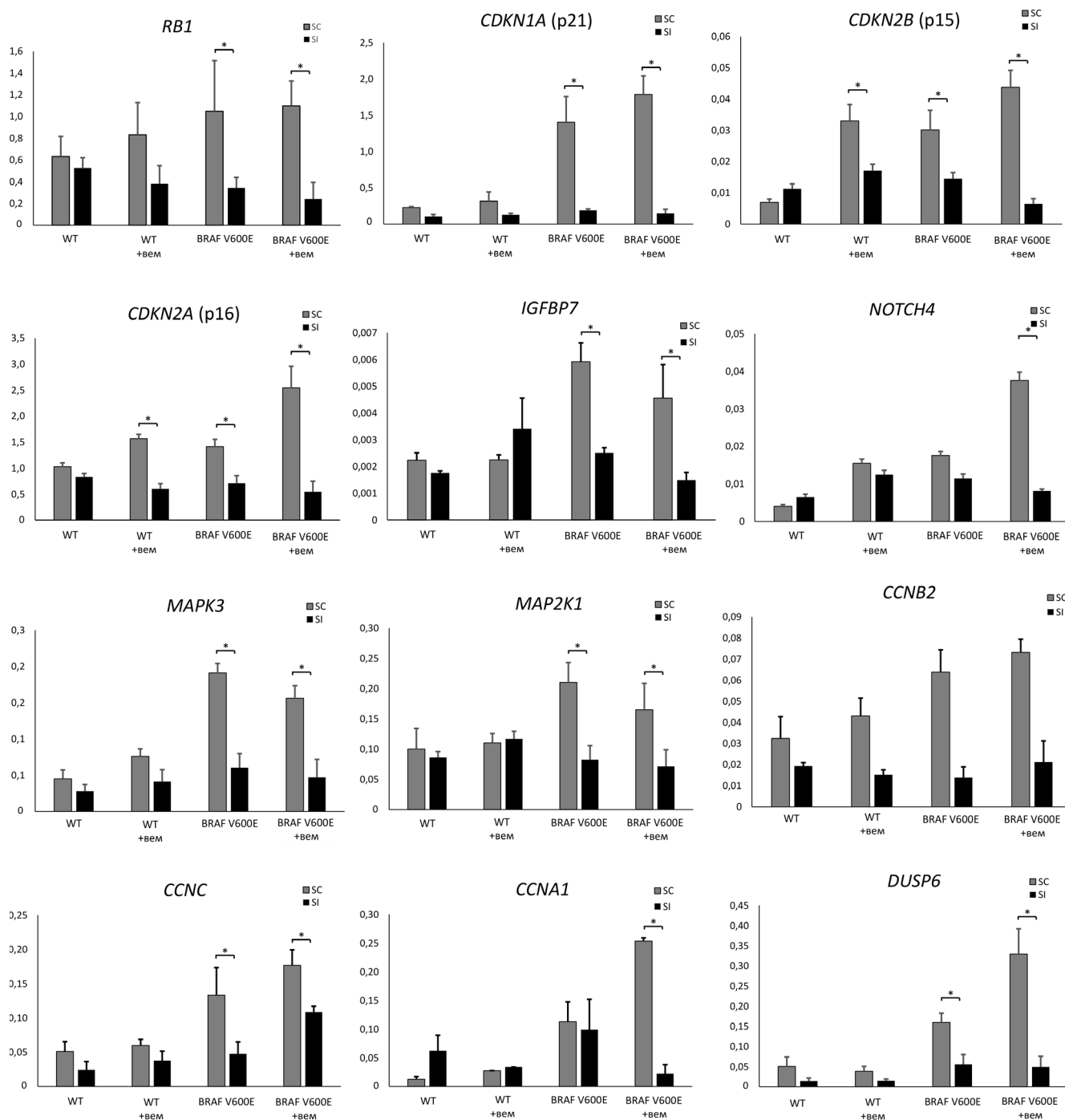


Рис. 3. Относительный уровень экспрессии ряда генов после подавления экспрессии гена *PTPN11* с помощью миРНК и/или селективного ингибирования BRAF V600E с использованием вемурафениба. По оси абсцисс указаны разные варианты исследуемых клеток, исходные клетки «WT» и клетки, экспрессирующие исследуемый онкоген «BRAF V600E», необработанные или обработанные вемурафенибом (+vem). Клетки, обработанные миРНК к гену *PTPN11*, обозначены «SI», клетки, обработанные контрольными РНК, обозначены «SC». Приведены уровни экспрессии генов, нормализованные на экспрессию гена *GAPDH* (ось ординат). * — Означает достоверное отличие от образца, трансфицированного контрольными (scrambled) РНК (scRNA) (p -значение < 0,05 по критерию Стьюдента)

частота развития острого лимфобластного лейкоза в мышинной модели [49], а высокий уровень экспрессии *CCNB2* и *CCNC* может наблюдаться при развитии различных опухолей: колорек-

тальной аденокарциноме, раке молочной железы [50] и аденоме гипофиза [51]. Подавление экспрессии гена *PTPN11* приводит к снижению влияния BRAF V600E на экспрессию генов цик-

линов *CCNA1*, *CCNB2* и *CCNC* и гена *Notch4*, что указывает на неоднозначную роль фосфатазы SHP-2 в развитии опухолей с мутацией BRAF V600E.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нарушение пути передачи сигналов RAS/RAF/MEK/ERK характерно для многих типов человеческих опухолей. Система контроля активности компонентов MAPK-каскада строится на негативной обратной связи между самими компонентами каскада. При нормальной активации данного каскада последовательно активируется ряд его элементов, однако при появлении конститутивно активного участника каскада (например, BRAF V600E) или при ингибировании какого-то элемента каскада механизмы обратной связи могут соответственно блокировать или реактивировать прохождение сигнала по каскаду. Мы предполагаем, что SHP-2 может играть важную роль в подобной регуляции данного каскада: с одной стороны, участвовать в реактивации пролиферации в случае ингибирования определенных элементов, а с другой стороны, подавлять деление клеток, экспрессирующих конститутивно-активный компонент каскада. Так было показано, что единичное терапевтическое ингибирование одного компонента MAPK-каскада при опухолях различной этиологии (например, MEK или RAF) приводит к повышению экспрессии различных рецепторных тирозинкиназ и, как следствие, возникновению адаптивной устойчивости опухоли к ингибитору [52–55]. Однако комбинация ингибиторов против SHP-2 и ALK или MEK позволяет эффективно подавлять рост опухолевых клеток с нарушенной регуляцией ALK [56] и RAS [57]. Полученные нами данные о роли SHP-2 в регуляции транскрипции генов (*Notch4*, *CCNA1*), связанных с активацией опухолевого роста в ответ на экспрессию онкогена BRAF V600E в присутствии вемурафениба, также указывают на способность SHP-2 участвовать в реактивации регуляции пролиферации клеток в ответ на

подавление компонентов каскада RAS/RAF/MEK/ERK. С другой стороны, согласно полученным нами данным фосфатаза SHP-2 играет важную роль в активации транскрипции факторов *p15*, *p16*, *p21*, *RB1* и *IGFBP7*, участвующих в ОИС, вызванной экспрессией BRAF V600E, причем вемурафениб может удваивать ингибирующий эффект от подавления экспрессии *PTPN11* в случае генов *p15* и *IGFBP7*.

Таким образом, согласно нашему предположению, фосфатаза SHP-2 может играть важную роль в регуляции MAPK-каскада и как фактор, передающий сигнал от EGFR, HER2 и др., и как важный фактор, участвующий в негативной регуляции каскада при нарушении его работы. Этим может объясняться двоякое влияние данной фосфатазы на процессы онкогенеза в зависимости от наличия или отсутствия мутаций компонентов MAPK-каскада и компонентов ОИС, а также в зависимости от используемой терапии. Данные, представленные в этой статье, указывают на возможные неоднозначные последствия подавления SHP-2 в клетках конститутивно-активных участников каскада RAS/RAF/MEK/ERK. С одной стороны, блокировка данной фосфатазы позволяет предотвращать реактивацию пролиферации клеток в ответ на использование ингибиторов отдельных компонентов каскада, с другой – подавление SHP-2 может привести к активации пролиферации клеток из-за нарушения ОИС.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 18-315-00171 мол а; лентивирусный вектор, содержащий ген BRAF V600E и данные для рис. 1, получены при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 16-15-10423).

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований или с использованием животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Burotto, M., Chiou, V.L., Lee, J.M., and Kohn, E.C. (2014) The MAPK pathway across different malignancies: a new perspective, *Cancer*, **120**, 3446–3456, doi: 10.1002/cncr.28864.
2. Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., et al. (2002) Mutations of the BRAF gene in human cancer, *Nature*, **417**, 949–954, doi: 10.1038/nature00766.
3. Mesa, C. Jr., Mirza, M., Mitsutake, N., Sartor, M., Medvedovic, M., Tomlinson, C., Knauf, J.A., Weber, G.F., and Fagin, J.A. (2006) Conditional activation of RET/PTC3 and BRAFV600E in thyroid cells is associated with gene expression profiles that predict a preferential role of BRAF in extracellular matrix remodeling, *Cancer Res.*, **66**, 6521–6529, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0739.

4. Long, G.V., Menzies, A.M., Nagrial, A.M., Haydu, L.E., Hamilton, A.L., Mann, G.J., Hughes, T.M., Thompson, J.F., Scolyer, R.A., and Kefford, R.F. (2011) Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma, *J. Clin. Oncol.*, **29**, 1239–1246, doi: 10.1200/JCO.2010.32.4327.
5. Loh, M.L., Vattikuti, S., Schubert, S., Reynolds, M.G., Carlson, E., Lieu, K.H., Cheng, J.W., Lee, C.M., Stokoe, D., Bonifas, J.M., Curtiss, N.P., Gotlib, J., Meshinchi, S., Le Beau, M.M., Emanuel, P.D., and Shannon, K.M. (2004) Mutations in *PTPN11* implicate the SHP-2 phosphatase in leukemogenesis, *Blood*, **103**, 2325–2331, doi: 10.1182/blood-2003-09-3287.
6. Mohi, M.G., Williams, I.R., Dearolf, C.R., Chan, G., Kutok, J.L., Cohen, S., Morgan, K., Boulton, C., Shigematsu, H., Keilhack, H., Akashi, K., Gilliland, D.G., and Neel, B.G. (2005) Prognostic, therapeutic, and mechanistic implications of a mouse model of leukemia evoked by Shp2 (*PTPN11*) mutations, *Cancer Cell*, **7**, 179–191, doi: 10.1016/j.ccr.2005.01.010.
7. Tartaglia, M., Mehler, E.L., Goldberg, R., Zampino, G., Brunner, H.G., Kremer, H., van der Burgt, I., Crosby, A.H., Ion, A., Jeffery, S., Kalidas, K., Patton, M.A., Kucherlapati, R.S., and Gelb, B.D. (2001) Mutations in *PTPN11*, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome, *Nat. Genet.*, **29**, 465–468, doi: 10.1038/ng772.
8. Chan, G., Kalaitzidis, D., and Neel, B.G. (2008) The tyrosine phosphatase Shp2 (*PTPN11*) in cancer, *Cancer Metastasis Rev.*, **27**, 179–192, doi: 10.1007/s10555-008-9126-y.
9. Chan, R.J., and Feng, G.S. (2007) *PTPN11* is the first identified proto-oncogene that encodes a tyrosine phosphatase, *Blood*, **109**, 862–867, doi: 10.1182/blood-2006-07-028829.
10. Li, S.M. (2016) Биологические функции SHP2 при заболеваниях человека, *Мол. Биол. (Москва)*, **50**, 27–33, doi: 10.7868/S0026898416010110.
11. Matozaki, T., Murata, Y., Saito, Y., Okazawa, H., and Ohnishi, H. (2009) Protein tyrosine phosphatase SHP-2: a proto-oncogene product that promotes Ras activation, *Cancer Sci.*, **100**, 1786–1793, doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01257.x.
12. Zhang, S.Q., Tsiaras, W.G., Araki, T., Wen, G., Minichiello, L., Klein, R., and Neel, B.G. (2002) Receptor-specific regulation of phosphatidylinositol 3'-kinase activation by the protein tyrosine phosphatase Shp2, *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 4062–4072.
13. Saxton, T.M., Henkemeyer, M., Gasca, S., Shen, R., Rossi, D.J., Shalaby, F., Feng, G.S., and Pawson, T. (1997) Abnormal mesoderm patterning in mouse embryos mutant for the SH2 tyrosine phosphatase Shp-2, *EMBO J.*, **16**, 2352–2364, doi: 10.1093/emboj/16.9.2352.
14. Tajan, M., Batut, A., Cadoudal, T., Deleruyelle, S., Le Gonidec, S., Saint Laurent, C., Vomscheid, M., Wancq, E., Treguer, K., De Rocca Serra-Nedelec, A., Vinel, C., Marques, M.A., Pozzo, J., Kunduzova, O., Salles, J.P., Tauber, M., Raynal, P., Cave, H., Edouard, T., Valet, P., and Yart, A. (2014) LEOPARD syndrome-associated SHP2 mutation confers leanness and protection from diet-induced obesity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, E4494–E4503, doi: 10.1073/pnas.1406107111.
15. Chen, L., Chen, W., Mysliwski, M., Serio, J., Ropa, J., Abulwerdi, F.A., Chan, R.J., Patel, J.P., Tallman, M.S., Paietta, E., Melnick, A., Levine, R.L., Abdel-Wahab, O., Nikolovska-Coleska, Z., and Muntean, A.G. (2015) Mutated *Ptpn11* alters leukemic stem cell frequency and reduces the sensitivity of acute myeloid leukemia cells to Mcl1 inhibition, *Leukemia*, **29**, 1290–1300, doi: 10.1038/leu.2015.18.
16. Qu, C.K., Shi, Z.Q., Shen, R., Tsai, F.Y., Orkin, S.H., and Feng, G.S. (1997) A deletion mutation in the SH2-N domain of Shp-2 severely suppresses hematopoietic cell development, *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 5499–5507.
17. Bard-Chapeau, E.A., Li, S., Ding, J., Zhang, S.S., Zhu, H.H., Princen, F., Fang, D.D., Han, T., Bailly-Maitre, B., Poli, V., Varki, N.M., Wang, H., and Feng, G.S. (2011) *Ptpn11*/Shp2 acts as a tumor suppressor in hepatocellular carcinogenesis, *Cancer Cell*, **19**, 629–639, doi: 10.1016/j.ccr.2011.03.023.
18. Yang, W., Wang, J., Moore, D.C., Liang, H., Dooner, M., Wu, Q., Terek, R., Chen, Q., Ehrlich, M.G., Quesenberry, P.J., and Neel, B.G. (2013) *Ptpn11* deletion in a novel progenitor causes metachondromatosis by inducing hedgehog signalling, *Nature*, **499**, 491–495, doi: 10.1038/nature12396.
19. Hill, K.S., Roberts, E.R., Wang, X., Marin, E., Park, T.D., Son, S., Ren, Y., Fang, B., Yoder, S., Kim, S., Wan, L., Sarnaik, A.A., Koomen, J.M., Messina, J.L., Teer, J.K., Kim, Y., Wu, J., Chalfant, C.E., and Kim, M. (2019) *PTPN11* plays oncogenic roles and is a therapeutic target for *BRAF* wild-type melanomas, *Mol. Cancer Res.*, **17**, 583–593, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-18-0777.
20. Zhan, Y., Counelis, G.J., and O'Rourke, D.M. (2009) The protein tyrosine phosphatase SHP-2 is required for EGFRvIII oncogenic transformation in human glioblastoma cells, *Exp. Cell Res.*, **315**, 2343–2357, doi: 10.1016/j.yexcr.2009.05.001.
21. Hu, Z.Q., Ma, R., Zhang, C.M., Li, J., Li, L., Hu, Z.T., Gao, Q.I., and Li, W.M. (2015) Expression and clinical significance of tyrosine phosphatase SHP2 in thyroid carcinoma, *Oncol. Lett.*, **10**, 1507–1512, doi: 10.3892/ol.2015.3479.
22. Prahallad, A., Heynen, G.J., Germano, G., Willems, S.M., Evers, B., Vecchione, L., Gambino, V., Liefink, C., Beijersbergen, R.L., Di Nicolantonio, F., Bardelli, A., and Bernards, R. (2015) *PTPN11* is a central node in intrinsic and acquired resistance to targeted cancer drugs, *Cell Rep.*, **12**, 1978–1985, doi: 10.1016/j.celrep.2015.08.037.
23. Schneeberger, V.E., Ren, Y., Luetke, N., Huang, Q., Chen, L., Lawrence, H.R., Lawrence, N.J., Haura, E.B., Koomen, J.M., Coppola, D., and Wu, J. (2015) Inhibition of Shp2 suppresses mutant EGFR-induced lung tumors in transgenic mouse model of lung adenocarcinoma, *Oncotarget*, **6**, 6191–6202, doi: 10.18632/oncotarget.3356.
24. Chen, Y.N., LaMarche, M.J., Chan, H.M., Fekkes, P., Garcia-Fortanet, J., et al. (2016) Allosteric inhibition of SHP2 phosphatase inhibits cancers driven by receptor tyrosine kinases, *Nature*, **535**, 148–152, doi: 10.1038/nature18621.
25. Chapman, P.B., Hauschild, A., Robert, C., Haanen, J.B., Ascierto, P., et al. (2011) Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation, *N. Engl. J. Med.*, **364**, 2507–2516, doi: 10.1056/NEJMoa1103782.
26. Montero-Conde, C., Ruiz-Llorente, S., Dominguez, J.M., Knauf, J.A., Viale, A., Sherman, E.J., Ryder, M., Ghossein, R.A., Rosen, N., and Fagin, J.A. (2013) Relief of feedback inhibition of HER3 transcription by RAF and MEK inhibitors attenuates their antitumor effects in BRAF-mutant thyroid carcinomas, *Cancer Discov.*, **3**, 520–533, doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0531.
27. Nazarian, R., Shi, H., Wang, Q., Kong, X., Koya, R.C., Lee, H., Chen, Z., Lee, M.K., Attar, N., Sazegar, H., Chodon, T., Nelson, S.F., McArthur, G., Sosman, J.A., Ribas, A., and Lo, R.S. (2010) Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation, *Nature*, **468**, 973–977, doi: 10.1038/nature09626.
28. Boehm, J.S., Zhao, J.J., Yao, J., Kim, S.Y., Firestein, R., Dunn, I.F., Sjöström, S.K., Garraway, L.A., Wernemowicz, S.,

- Richardson, A.L., Greulich, H., Stewart, C.J., Mulvey, L.A., Shen, R.R., Ambrogio, L., Hirozane-Kishikawa, T., Hill, D.E., Vidal, M., Meyerson, M., Grenier, J.K., Hinkle, G., Root, D.E., Roberts, T.M., Lander, E.S., Polyak, K., and Hahn, W.C. (2007) Integrative genomic approaches identify IKBKE as a breast cancer oncogene, *Cell*, **129**, 1065–1079, doi: 10.1016/j.cell.2007.03.052.
29. 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.
30. Liu, Z., Zhao, Y., Fang, J., Cui, R., Xiao, Y., and Xu, Q. (2017) SHP2 negatively regulates HLA-ABC and PD-L1 expression via STAT1 phosphorylation in prostate cancer cells, *Oncotarget*, **8**, 53518–53530, doi: 10.18632/oncotarget.18591.
31. 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.bbarm.2016.07.004.
32. 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.
33. Bolger, A.M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data, *Bioinformatics*, **30**, 2114–2120, doi: 10.1093/bioinformatics/btu170.
34. Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T.R. (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner, *Bioinformatics*, **29**, 15–21, doi: 10.1093/bioinformatics/bts635.
35. Liao, Y., Smyth, G.K., and Shi, W. (2014) featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features, *Bioinformatics*, **30**, 923–930, doi: 10.1093/bioinformatics/btt656.
36. Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2, *Genome Biol.*, **15**, 550, doi: 10.1186/s13059-014-0550-8.
37. Zhou, Y., Zhou, B., Pache, L., Chang, M., Khodabakhshi, A.H., Tanaseichuk, O., Benner, C., and Chanda, S.K. (2019) Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets, *Nat. Commun.*, **10**, 1523, doi: 10.1038/s41467-019-09234-6.
38. Castellone, M.D., De Falco, V., Rao, D.M., Bellelli, R., Muthu, M., Basolo, F., Fusco, A., Gutkind, J.S., and Santoro, M. (2009) The beta-catenin axis integrates multiple signals downstream from RET/papillary thyroid carcinoma leading to cell proliferation, *Cancer Res.*, **69**, 1867–1876, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1982.
39. Giordano, T.J., Kuick, R., Thomas, D.G., Misesk, 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.
40. Nucera, C., Porrello, A., Antonello, Z.A., Mekel, M., Nehs, M.A., Giordano, T.J., Gerald, D., Benjamin, L.E., Priolo, C., Puxeddu, E., Finn, S., Jarzab, B., Hodin, R.A., Pontecorvi, A., Nose, V., Lawler, J., and Parangi, S. (2010) B-Raf(V600E) and thrombospondin-1 promote thyroid cancer progression, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 10649–10654, doi: 10.1073/pnas.1004934107.
41. 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.
42. 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 Genom. Proteomics*, **14**, 53–67, doi: 10.21873/cgp.20018.
43. Coppe, J.P., Desprez, P.Y., Krtolica, A., and Campisi, J. (2010) The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression, *Annu. Rev. Pathol.*, **5**, 99–118, doi: 10.1146/annurev-pathol-121808-102144.
44. Hardy, K.M., Kirschmann, D.A., Seftor, E.A., Margaryan, N.V., Postovit, L.M., Strizzi, L., and Hendrix, M.J. (2010) Regulation of the embryonic morphogen Nodal by Notch4 facilitates manifestation of the aggressive melanoma phenotype, *Cancer Res.*, **70**, 10340–10350, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0705.
45. Kim, Y.H., Choi, Y.W., Han, J.H., Lee, J., Soh, E.Y., Park, S.H., Kim, J.H., and Park, T.J. (2014) TSH signaling overcomes B-RafV600E-induced senescence in papillary thyroid carcinogenesis through regulation of DUSP6, *Neoplasia*, **16**, 1107–1120, doi: 10.1016/j.neo.2014.10.005.
46. Moulana, F.I., Priyani, A.A.H., de Silva, M.V.C., and Dassanayake, R.S. (2018) BRAF-oncogene-induced senescence and the role of thyroid-stimulating hormone signaling in the progression of papillary thyroid carcinoma, *Horm. Cancer*, **9**, 1–11, doi: 10.1007/s12672-017-0315-4.
47. Simões, B.M., O'Brien, C.S., Eyre, R., Silva, A., Yu, L., Sarmiento-Castro, A., Alférez, D.G., Spence, K., Santiago-Gomez, A., Chami, F., Acar, A., Gandhi, A., Howell, A., Brennan, K., Ryden, L., Catalano, S., et al. (2015) Anti-estrogen resistance in human breast tumors is driven by JAG1-NOTCH4-dependent cancer stem cell activity, *Cell Rep.*, **12**, 1968–1977, doi: 10.1016/j.celrep.2015.08.050.
48. Huang, K.C., Yang, J., Ng, M.C., Ng, S.K., Welch, W.R., Muto, M.G., Berkowitz, R.S., and Ng, S.W. (2016) Cyclin A1 expression and paclitaxel resistance in human ovarian cancer cells, *Eur. J. Cancer*, **67**, 152–163, doi: 10.1016/j.ejca.2016.08.007.
49. Liao, C., Wang, X.Y., Wei, H.Q., Li, S.Q., Merghoub, T., Pandolfi, P.P., and Wolgemuth, D.J. (2001) Altered myelopoiesis and the development of acute myeloid leukemia in transgenic mice overexpressing cyclin A1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 6853–6858, doi: 10.1073/pnas.121540098.
50. Valladares, A., Hernandez, N.G., Gomez, F.S., Curiel-Quezada, E., Madrigal-Bujaidar, E., Vergara, M.D., Martinez, M.S., and Arenas Aranda, D.J. (2006) Genetic expression profiles and chromosomal alterations in sporadic breast cancer in Mexican women, *Cancer Genet. Cytogenet.*, **170**, 147–151, doi: 10.1016/j.cancergencyto.2006.06.002.
51. Takashima, S., Saito, H., Takahashi, N., Imai, K., Kudo, S., Atari, M., Saito, Y., Motoyama, S., and Minamiya, Y. (2014) Strong expression of cyclin B2 mRNA correlates with a poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer, *Tumour Biol.*, **35**, 4257–4265, doi: 10.1007/s13277-013-1556-7.
52. Ahmed, T.A., Adamopoulos, C., Karoulia, Z., Wu, X., Sachidanandam, R., Aaronson, S.A., and Poulikakos, P.I. (2019) SHP2 Drives adaptive resistance to ERK signaling

- inhibition in molecularly defined subsets of ERK-dependent tumors, *Cell Rep.*, **26**, 65–78 e65, doi: 10.1016/j.celrep.2018.12.013.
53. Corcoran, R.B., Ebi, H., Turke, A.B., Coffee, E.M., Nishino, M., Cogdill, A.P., Brown, R.D., Della Pelle, P., Dias-Santagata, D., Hung, K.E., Flaherty, K.T., Piris, A., Wargo, J.A., Settleman, J., Mino-Kenudson, M., and Engelman, J.A. (2012) EGFR-mediated re-activation of MAPK signaling contributes to insensitivity of BRAF mutant colorectal cancers to RAF inhibition with vemurafenib, *Cancer Discov.*, **2**, 227–235, doi: 10.1158/2159-8290.CD-11-0341.
 54. Duncan, J.S., Whittle, M.C., Nakamura, K., Abell, A.N., Midland, A.A., Zawistowski, J.S., Johnson, N.L., Granger, D.A., Jordan, N.V., Darr, D.B., Usary, J., Kuan, P.F., Smalley, D.M., Major, B., He, X., Hoadley, K.A., Zhou, B., Sharpless, N.E., Perou, C.M., Kim, W.Y., Gomez, S.M., Chen, X., Jin, J., Frye, S.V., Earp, H.S., Graves, L.M., and Johnson, G.L. (2012) Dynamic reprogramming of the kinome in response to targeted MEK inhibition in triple-negative breast cancer, *Cell*, **149**, 307–321, doi: 10.1016/j.cell.2012.02.053.
 55. Karouliia, Z., Wu, Y., Ahmed, T.A., Xin, Q., Bollard, J., Krepler, C., Wu, X., Zhang, C., Bollag, G., Herlyn, M., Fagin, J.A., Lujambio, A., Gavathiotis, E., and Poulidakos, P.I. (2016) An integrated model of RAF inhibitor action predicts inhibitor activity against oncogenic BRAF signaling, *Cancer Cell*, **30**, 485–498, doi: 10.1016/j.ccell.2016.06.024.
 56. Dardaei, L., Wang, H.Q., Singh, M., Fordjour, P., Shaw, K.X., et al. (2018) SHP2 inhibition restores sensitivity in ALK-rearranged non-small-cell lung cancer resistant to ALK inhibitors, *Nat. Med.*, **24**, 512–517, doi: 10.1038/nm.4497.
 57. Mainardi, S., Mulero-Sanchez, A., Prahallad, A., Germano, G., Bosma, A., Krimpenfort, P., Lieftink, C., Steinberg, J.D., de Wit, N., Goncalves-Ribeiro, S., Nadal, E., Bardelli, A., Villanueva, A., and Bernards, R. (2018) SHP2 is required for growth of KRAS-mutant non-small-cell lung cancer *in vivo*, *Nat. Med.*, **24**, 961–967, doi: 10.1038/s41591-018-0023-9.

***PTPN11* KNOCKDOWN PREVENTS CHANGES IN THE EXPRESSION OF GENES CONTROLLING CELL CYCLE, CHEMOTHERAPY RESISTANCE, AND ONCOGENE-INDUCED SENEESCENCE IN HUMAN THYROID CELLS OVEREXPRESSING BRAF V600E ONCOGENIC PROTEIN^{*,**}**

L. V. Putlyayeva^{1,2}, D. E. Demin^{1,3}, A. N. Uvarova^{1,4}, L. S. Zinevich⁵, M. M. Prokofjeva¹,
G. R. Gazizova⁶, E. I. Shagimardanova⁶, and A. M. Schwartz^{1***}

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

² Center of Life Sciences, Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russia

³ Moscow Institute of Physics and Technology, 141701 Dolgoprudnyi, Moscow Region, Russia

⁴ Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 119234 Moscow, Russia

⁵ Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia

⁶ Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, 420008 Kazan, Russia

Received September 21, 2019

Revised September 21, 2019

Accepted October 20, 2019

The MAPK (RAS/BRAF/MEK/ERK) signaling pathway is a kinase cascade involved in the regulation of cell proliferation, differentiation, and survival in response to external stimuli. The V600E mutation in the *BRAF* gene has been detected in various tumors, resulting in a 500-fold increase in the BRAF kinase activity. However, monotherapy with selective BRAF V600E inhibitors often leads to the reactivation of MAPK signaling cascade and emergence of drug resistance. Therefore, new targets are being developed for the inhibition of components of the aberrantly activated cascade. It was recently discovered that resistance to the BRAF V600E inhibitors may be associated with the activity of the tyrosine phosphatase SHP-2 encoded by the *PTPN11* gene. In this paper, we analyzed transcriptional effects of the *PTPN11* gene knockdown and selective suppression of BRAF V600E in a model of thyroid follicular epithelium. We found that the siRNA-mediated knockdown of *PTPN11* after vemurafenib treatment prevented an increase in the expression of *CCNA1* and *NOTCH4* genes involved in the formation of drug resistance of tumors. On the other hand, downregulation of *PTPN11* expression blocked the transcriptional activation of genes (*p21*, *p15*, *p16*, and *IGFBP7*) involved in the cell cycle regulation and oncogene-induced senescence in response to the BRAF V600E expression. Therefore, it can be assumed that SHP-2 participates not only in the drug resistance emergence in cancer cells, but also in the oncogene-induced cell senescence.

Keywords: SHP-2, BRAF V600E, thyroid tumor, oncogene-induced senescence