

В.Г. Хоперія, О.С. Ларін, В.В. Васько*

РОЛЬ ЕКСПРЕСІЇ Е-КАДГЕРИНУ В ПРОЦЕСІ ІНВАЗІЇ ПАПІЛЯРНОГО РАКУ ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ

*Український науково-практичний центр ендокринної хірургії,
трансплантації ендокринних органів і тканин МОЗ України, Київ*

**Педіатричний факультет Університету силових структур, Бетезда (США)*

ВСТУП

Папілярний рак (ПР) щитоподібної залози (ЩЗ) характеризується лімфогенним метастазуванням, у 50% випадків метастази у регіонарних лімфовузлах виявляються під час операції [1]. Крім того, лімфатичні вузли є найбільш поширеним місцем рецидиву ПР, а частота виявлення рецидиву ПР у лімфовузлах складає 38,5-58,8%. Отже, розуміння молекулярних механізмів інвазії клітин РЩЗ, їх виживання у метастазах має вирішальне значення для розробки ефективної терапії.

Для пухлин РЩЗ *in vivo* та *in vitro* виявлено зв'язок процесів їх інвазії та метастазування з індукцією епітеліально-мезенхімальної трансформації (ЕМТ) [2, 3]. Епітеліальні клітини у процесі ЕМТ втрачають клітинні контакти та набувають міграційного фенотипу. Ген *CDH1* (*16q22.1*) кодує трансмембранний глікопротеїн Е-кадгерину, який відіграє важливу роль у міжклітинній адгезії епітеліальних клітин. Зниження експресії Е-кадгерину є характерною ознакою ЕМТ [4]. Активація сигнальних шляхів внаслідок мутації онкогена індукуює ЕМТ. Попередні дослідження показали, що сигнальні шляхи *HGF/cMET* [5], *TGF-β/Smurf1* [6] і *MAPK/ERK* [7] беруть участь у регуляції ЕМТ. Епігенетичні механізми контролюють ЕМТ шляхом регуляції рівня експресії Е-кадгерину. Результатами попередніх досліджень виявлено зменшення експресії Е-кадгерину внаслідок гіперметилування промотору його гена в різних злоякісних пухлинах, у тому числі за лейкемії [8], раку молочної залози [9] та колоректального раку [10].

Внутрішньоклітинне розташування Е-кадгерину має вирішальне значення для його функції та регулюється фосфорилуванням [11]. Активація тирозинкіназ призводить до втрати кадгерин-опосередкованої адгезії клітин шляхом активації ендоцитозу Е-кадгерину. Доведено роль протеїнкінази C (ПКС) у регуляції ендоцитозу і

переробки Е-кадгерину. Показано, що в клітинах раку, оброблених форболовим ефіром, підвищується швидкість ендоцитозу Е-кадгерину, що призводить до зниження рівня його мембранної експресії [12]. Чинник некрозу пухлин α (ЧНП)- α , який є медіатором запалення, індукуює ЕМТ шляхом протеїнкіназозалежної активації ЧНП- β [13].

За даними попередніх імуногістохімічних досліджень і ДНК мікročіп-аналізу виявлено значне зменшення експресії Е-кадгерину за низько диференційованого раку [14, 15]. Аберантне метилування промотору Е-кадгерину продемонстровано у 23-83% випадків ПР ЩЗ [16, 17]. Ці дослідження також показують, що втрата експресії Е-кадгерину відіграє роль у розвитку метастазів РЩЗ. За результатами наших досліджень, профіль експресії генів клітин інвазійного РЩЗ відповідає ЕМТ [18]. Проте мезенхімальні особливості інвазійних клітин РЩЗ у метастазах не вивчалися. З метою дослідження даного факту ми розглянули статус метилування промотору гена Е-кадгерину у серії ПР ЩЗ і відповідних метастазів у лімфовузлах. Для встановлення взаємозв'язку між експресією гена Е-кадгерину та рухливістю клітин раку використовували клітинні лінії РЩЗ.

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ

Матеріалом для дослідження послужили гістологічні препарати пухлин 66 пацієнтів, прооперованих з приводу ПР ЩЗ. В усіх випадках діагноз ПР встановлено на гістологічних препаратах, забарвлених гематоксилін-еозином, двома досвідченими патологоанатомами відповідно до критеріїв ВООЗ 2004 року. Оцінку онкогенного статусу мутацій у первинних пухлинах ПР проведено у попередньому дослідженні [18]. У 34 випадках ПР, крім первинної пухлини, досліджували метастази у лімфатичних вузлах.

Виділення ДНК і РНК проведено з парафіно-

вих препаратів пухлин і клітинних культур ПР із застосуванням TRIzol реагенту. Ампліфіковані продукти візуалізували після електрофорезу на 2% розчині поліакриламідного гелю.

Імуногістохімічні дослідження проведено із застосуванням специфічних антитіл до Е-кадгерину (sc-21791) та універсального набору Vectastain Universal Quick kit. Для кожного дослідження включено негативні контролю без додавання первинних антитіл. Імунофлюоресцентне дослідження проведено з використанням відповідних вторинних антитіл і набору Prolong anti-fade kit.

Клітинні лінії РЩЗ людини (TPC1, FTC133, FTC236, FTC238 і WRO82-1) вирощували у середовищі RPMI-1640 medium (Invitrogen) та обробляли фармакологічним інгібітором PI3K/АКТ сигнального шляху, ЧНП- α та 5-аза-2'-деоксцитидином, та інгібітором MEK1/2 (Cell Signaling Technology).

Експериментальну модель міграції досліджували в камері Боуена з мембраною, вкритою матригелем. Ефективність міграції оцінювали за допомогою мембранного забарвлення за методом Diff-Quick kit. Ступінь росту клітин досліджували з використанням набору для оцінки життєздатності клітин Vi-CELL™ Cell Viability Analyzer відповідно до інструкцій виробника.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Метилування промотору Е-кадгерину досліджено в пухлинах РЩЗ та оточуючій тканині залози. У 26/66 (39,3%) випадків ПР ЩЗ виявлено гіперметилування 5'СрG острівців промотору Е-кадгерину. В оточуючій нормальній тканині ЩЗ метилування Е-кадгерину виявлено в 1/22 (4,5%) випадку. У цих випадках під час гістологічного дослідження виявлено ознаки хронічного тиреоїдиту. Клініко-морфологічну характерис-

тику випадків ПР ЩЗ залежно від статусу метилування промотору Е-кадгерину наведено у табл. 1.

У ході гістологічного дослідження пухлини ЩЗ гіперметилування промотору гена Е-кадгерину виявлялося частіше у випадках класичного ПР ЩЗ, ніж його фолікулярного варіанта (ФВ). Метилування промотору Е-кадгерину асоціювалося з ознаками несприятливого прогнозу (екстра-органна інвазія, метастази у лімфовузлах).

Гіперметилування промотору Е-кадгерину виявлено у 8/30 (26,6%), 1/8 (12,5%) і 0/5 (0%) пухлин із BRAF, RET і RAS мутаціями відповідно. У випадках ПР ЩЗ без мутацій гіперметилування Е-кадгерину виявлено у 8/28 (28,5%) випадках. Кореляція між метилуванням промотору Е-кадгерину та мутаціями онкогенів ЩЗ не була статистично значущою.

У нормальній тканині залози інтенсивну експресію Е-кадгерину виявлено в епітеліальних клітинах, а у клітинах строми вона була відсутня. В усіх випадках ПР ЩЗ із гіперметильованим промотором Е-кадгерину і в 16/40 (40%) випадках ПР із неметильованим Е-кадгеріном виявлено зниження інтенсивності його експресії. Втрата експресії Е-кадгерину асоціювалася з лімфоїдною інфільтрацією строми пухлин і наявністю метастазів. Не було встановлено кореляції між мутаціями онкогенів ЩЗ і рівнем експресії Е-кадгерину.

Ми припустили, що клітини РЩЗ у зонах інвазії мають підвищену рухливість внаслідок гіперметилування промотору Е-кадгерину та зниження його експресії. Отже, у 10 випадках ПР досліджено окремо зони інвазії та центральні відділи пухлин. У 7 випадках ознаки метилування промотору Е-кадгерину і його експресії були схожими у центральних відділах пухлини і зонах інвазії. У 3 випадках відбувся перехід статусу

Таблиця 1

Клініко-морфологічна характеристика ПР ЩЗ залежно від статусу метилування промотору Е-кадгерину

Клініко-морфологічна ознака	Статус метилування промотору Е-кадгерину		p
	гіперметильований (26 випадків)	неметильований (40 випадків)	
Вік (роки)	43,1 $\pm$ 17,1	35,3 $\pm$ 12,2	0,2949
Розмір пухлини (мм)	33 $\pm$ 0,6	22 $\pm$ 0,8	0,4902
Стать (ч/ж)	6/20	16/24	0,0164
Багатофокусний ріст (є/немає)	12/14	12/14	0,2021
Метастази (є/немає)	1/25	16/24	0,0011

метилування промотору Е-кадгерину від неметильованого в центральних відділах до гіперметильованого у зонах інвазії.

Статус метилування промотору Е-кадгерину проаналізовано в первинних пухлинах ПР і метастазах у лімфовузлах (34 випадки). У 20/34 (60%) випадків метилування промотору Е-кадгерину було ідентичним у первинній пухлині та відповідному метастазі. У 10 випадках не виявлено метилування промотору Е-кадгерину у первинних пухлинах та метастазах. Гіперметилування промотору Е-кадгерину у первинній пухлині і у відповідних метастазах встановлено також у 10 випадках. У 14/34 (40%) випадків статус метилування Е-кадгерину у первинній пухлині і лімфовузлах відрізнявся. У 12 (35%) випадках промотор Е-кадгерину був гіперметильованим у первинній пухлині, але неметильованим у метастазах, у яких виявлено підвищений рівень експресії Е-кадгерину. У двох випадках (5%) гіперметилування промотору Е-кадгерину визначено лише у метастазах.

З метою вивчення ролі Е-кадгерину в регуляції рухливості клітин РЩЗ ми розглянули статус метилування промотору Е-кадгерину в клітинних лініях РЩЗ із різними фенотипами. У клітинних лініях ПР (TPC1), первинної пухлини фолікулярного раку (FTC133), регіонарного та легеневого метастазу фолікулярного раку ЩЗ (FTC236 і FTC238) виявлено морфологічні ознаки, характерні для мезенхімальної тканини (веретеноподібні клітини), тоді як у клітинах культури фолікулярного раку ЩЗ (WRO) клітини були округлими, тобто схожими на епітеліальні. У клітинах РЩЗ із морфологічними мезенхімальними ознаками виявлено гіперметилування промотору Е-кадгерину, а експресії РНК і білка виявлено не було. Навпаки, в клітинних лініях з епітелієподібними клітинами РЩЗ метилування Е-кадгерину виявлено не було, тоді як рівні експресії РНК і білка були очевидними. Визначено підвищену експресію Е-кадгерину в епітеліальних клітинах WRO.

У випадках Е-кадгерін-негативного РЩЗ клітини із мезенхімальними ознаками ефективно пенетрували мембрану у камері Бойдена, на відміну від Е-кадгерін-позитивних клітин WRO з епітеліальними ознаками.

З метою визначення статусу метилування Е-кадгерину та міграційної здатності клітин РЩЗ після обробки деметилувальними агентами клітини РЩЗ інкубували з 5-аза-2'-дезоксидити-

дином. Така обробка клітин РЩЗ не викликала змін статусу метилування промотору та експресії Е-кадгерину, не перешкождала міграції клітин. У клітинах із мезенхімальними морфологічними ознаками після обробки 5-аза-2'-дезоксидитином виявлено гальмування росту. Не визначено істотного впливу на ріст клітин РЩЗ з епітеліальними ознаками.

Відомо, що PI3K/AKT і RAS/ERK сигнальні шляхи відіграють важливу роль у регуляції процесу міграції клітин РЩЗ. Крім того, доведено, що активація сигналу ферменту протейнінази С (PKC) диефірфорболом (PMA) викликає морфологічні зміни в клітинах WRO.

З метою оцінки впливу активації PKC на рухливість клітин РЩЗ шляхом регуляції Е-кадгерину досліджено статус метилування промотору Е-кадгерину та експресії його білка під дією інгібітору PI3K/AKT (LY-294002), RAS/ERK (U-0126) і після лікування PMA. Під впливом інгібіторів LY-294002 і U-0126 виявлено гальмування міграції клітин РЩЗ із мезенхімальними ознаками. Проте втрату міграційної здатності не було пов'язано зі статусом метилування промотору Е-кадгерину, експресією його білка та зміною епітеліального фенотипу. Під дією PMA не визначено істотного впливу на рухливість клітин РЩЗ із мезенхімальними ознаками, але виявлено кардинальні морфологічні зміни епітеліальних клітин. Дія PMA проявлялася втратою клітинних контактів і набуттям мезенхімальних ознак у клітинах WRO. Хронічний вплив пухлинного промотору (PMA) спричинював втрату експресії Е-кадгерину у клітинах WRO та індукцію міграції. Не визначено змін статусу метилування промотору Е-кадгерину та експресії його білка після PMA-індукованої релокалізації Е-кадгерину з клітинної мембрани в цитоплазму.

З огляду на те, що зменшення експресії Е-кадгерину в клітинах ПР пов'язано з лімфоїдною інфільтрацією, ми припустили, що воно може ініціюватися ЧНП- α . Тривалий вплив ЧНП- α призводив до втрати експресії Е-кадгерину та індукції міграції клітин раку. Як і під дією PMA, зміна локалізації експресії Е-кадгерину не супроводжувалася зміною статусу його метилування та експресії. ЧНП- α -індукована втрата експресії Е-кадгерину виявилася нестійкою. Перехід від середовища, що містить ЧНП- α , до середовища, вільного від нього, призводив до відновлення морфологічних ознак і втрати міграційної здатності клітинами.

Набуття міграційного фенотипу відіграє ключову роль у процесах інвазії та метастазування клітин раку. Під клітинною міграцією зазвичай розуміється рух окремих клітин, які зазнають видовження-стискання. Зниження експресії Е-кадгерину вважається однією з основних молекулярних подій у процесі інвазії клітин.

Метилування промотору Е-кадгерину частіше виявлялося в пухлинах ПР ЩЗ із метастазами на момент операції порівняно з пухлинами без метастазів. Ці дані узгоджуються з попередніми дослідженнями, в яких виявлено високу частоту метилування промотору Е-кадгерину у випадках низько диференційованого метастатичного раку (19,20). Наші дані дозволяють припустити, що клітини РЩЗ із високою щільністю метилування та зменшеною експресією Е-кадгерину найбільш здатні до інвазії.

За результатами порівняльного аналізу у первинних пухлинах і відповідних лімфовузлах із метастазами виявлено динамічні зміни статусу метилування Е-кадгерину та його експресії у процесі метастазування. У значній частині випадків збільшення експресії Е-кадгерину у метастазах порівняно з первинними пухлинами було пов'язано з втратою епігенетичного гальмування. Отже, в метастазах РЩЗ можлива втрата мезенхімального фенотипу та мезенхімально-епітеліальний перехід. Ці дані підтверджують дані попередніх досліджень про те, що епігенетична інактивация Е-кадгерину є зворотною і може залежати від мікроекологічних чинників [21]. Доведено роль Е-кадгерину у процесі виживання клітин раку у метастазах. Так, виявлено значну експресію Е-кадгерину в емболах лімфатичних судин хворих на часточковий рак молочної залози [22]. Експресію Е-кадгерину виявлено і у метастазах Е-кадгерин-негативного колоректального раку [23].

У деяких випадках ПР ЩЗ виявлено підвищену експресію як у первинних пухлинах, так і в метастазах. Це свідчить, що метастази РЩЗ можуть виникати з клітин, які ніколи не втрачали експресії Е-кадгерину. Доведено роль Е-кадгерину у регуляції колективної міграції клітин раку [24, 25]. На відміну від одноклітинної, у ході колективної міграції клітини раку не втрачають міжклітинних контактів і мігрують групами [26]. Цілком можливо, що наведений механізм метастазування стосується і клітин РЩЗ.

У дослідженні *in vitro* виявлено прямий зв'язок між втратою експресії Е-кадгерину внас-

лідок метилування та рухливістю клітин РЩЗ. Тобто, РЩЗ із високою щільністю метилування і втратою експресії Е-кадгерину має здатність до метастазування.

Також вивчено взаємозв'язок між активацією онкоген-індукованих сигналів та епігенетичних механізмів у регуляції руху клітин ЩЗ. Активация PI3K/AKT і RAS/ERK сигнальних шляхів спричинює міграцію клітин раку незалежно від метилування та експресії Е-кадгерину. З іншого боку, вплив ЧНП- α на міграцію клітин пов'язано зі зміною внутрішньоклітинної локалізації Е-кадгерину.

Досліджено фармакологічний вплив 5-аза-2'-дезокситидину на клітини РЩЗ і не визначено підвищення експресії Е-кадгерину, проте виявлено менше мезенхімальних ознак. Також виявлено антипухлинну ефективність 5-аза-2'-дезокситидину (Decitabine) у пацієнтів із лейкемією і мієлодиспластичним синдромом, а клінічні випробування даного препарату в лікуванні хворих із метастатичним РЩЗ тривають. Наші дані показали, що Е-кадгерин-позитивні і негативні клітини РЩЗ дають різну відповідь на лікування 5-аза-2'-дезокситидином. Можливо, цей препарат може справляти різний ефект на клітини раку, розташовані у первинній пухлині та у метастазах.

ВИСНОВКИ

1. Експресія Е-кадгерину в клітинах РЩЗ регулюється епігенетичними механізмами.
2. У процесі метастазування виявлено динамічні зміни статусу метилування промотору Е-кадгерину.
3. Епігенетичні механізми й активація ЧНП- α -індукованих сигналів є незалежними чинниками інвазії клітин РЩЗ, дія цих чинників реалізується шляхом регуляції експресії та внутрішньоклітинної локалізації Е-кадгерину.
4. Механізми регуляції метилування Е-кадгерину відіграють важливу роль в індукції епітеліально-мезенхімального переходу в первинній пухлині, а також у зміні мезенхімального фенотипу на епітеліальний у метастазах.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Puxeddu E., Filetti S.* The 2009 American thyroid association guidelines for management of thyroid nodules and differentiated thyroid cancer: progress on the road from consensus- to evidence-based practice // *Thyroid.* – 2009. – Vol.19. – P. 1145-1147.

2. Shook Dand Keller R. Mechanisms, mechanics and function of epithelial-mesenchymal transitions in early development // *Mech. Dev.* – 2003. – Vol.120. – P.1351-1383.
3. Thiery J.P. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies // *Cur. Opin. Cell. Biol.* – 2003. – Vol.15. – P. 740-746.
4. Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator // *Science.* – 1991. – Vol.251. – P. 1451-1455.
5. Matteucci E., Ridolfi E., Desiderio M.A. Hepatocyte growth factor differently influences Met-E-cadherin phosphorylation and downstream signaling pathway in two models of breast cells // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2006. – Vol.63. – P. 2016-2026.
6. Wang H., Radjendirane V., Wary K.K., Chakrabarty S. Transforming growth factor beta regulates cell-cell adhesion through extracellular matrix remodeling and activation of focal adhesion kinase in human colon carcinoma Moser cells // *Oncogene.* – 2004. – Vol.23. – P. 5558-5561.
7. Honma N., Genda T., Matsuda Y., Yamagiwa S., Takamura M., Ichida Tand Aoyagi Y. MEK/ERK signaling is a critical mediator for integrin-induced cell scattering in highly metastatic hepatocellular carcinoma cells // *Lab. Invest.* – 2006. – Vol.86. – P. 687-696.
8. Corn P.G., Smith B.D., Ruckdeschel E.S., Douglas D., Baylin S.B., Herman J.G. E-cadherin expression is silenced by 5' CpG island methylation in acute leukemia // *Clin. Cancer. Res.* – 2000. – Vol.6. – P. 4243-4248.
9. Gagnon J., Shaker S., Primeau M., Hurtubise Aand Momparker R.L. Interaction of 5-aza-2'-deoxycytidine and depsipeptide on antineoplastic activity and activation of 14-3-3sigma, E-cadherin and tissue inhibitor of metalloproteinase 3 expression in human breast carcinoma cells // *Anticancer Drugs.* – 2003. – Vol.4. – P. 193-202.
10. Lind G.E., Thorstensen L., Lovig T., Meling G.I., Hamelin R., Rognum T.O., Esteller Mand / Lothe R.A. ACpG island hypermethylation profile of primary colorectal carcinomas and colon cancer cell lines // *Mol. Cancer.* – 2004. – Vol.3. – P. 28.
11. Jaggi M., Rao P.S., Smith D.J., Wheelock M.J., Johnson K.R., Hemstreet G.P., Balaji K.C. E-cadherin phosphorylation by protein kinase D1/protein kinase C{mu} is associated with altered cellular aggregation and motility in prostate cancer // *Cancer Res.* – 2005. – Vol.65. – P. 483-492.
12. Le T.L., Joseph S.R., Yap A.S., Stow J.L. Protein kinase Cregulates endocytosis and recycling of E-cadherin // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* – 2002. – Vol.283. – P. 489-499.
13. Takahashi E., Nagano O., Ishimoto T., Yae T., Suzuki Y., Shinoda T., Nakamura S., Niwa S., Ikeda S., Koga H., Tanihara Hand Saya H. TNF- α regulates TGF- β -dependent epithelial-mesenchymal transition by promoting hyaluronan-CD44-Moesin interaction // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Vol.285. – P. 4060-4073.
14. Fluge O., Bruland O., Akslen L.A., Lillehaug J. Rand Varhaug J.E. Gene expression in poorly differentiated papillary thyroid carcinomas // *Thyroid.* – 2006. – Vol.16. – P. 161-175.
15. Choi Y.L., Kim M.K., Suh J.W., Han J., Kim J.H., Yang J. Hand Nam S.J.: Immunoexpression of HBME-1, high molecular weight cytokeratin, cytokeratin 19, thyroid transcription factor-1, and E-cadherin in thyroid carcinomas // *J. Korean. Med. Sci.* – 2005. – Vol.20. – P. 853-859.
16. Graff J.R., Greenberg V.E., Herman J.G., Westra W.H., Boghaert E.R., Ain K.B., Saji M., Zeiger M.A., Zimmer S.G., Baylin S.B. Distinct patterns of E-cadherin CpG island methylation in papillary, follicular, Hurthle's cell, and poorly differentiated human thyroid carcinoma // *Cancer Res.* – 1998. – Vol.58. – P. 2063-2066.
17. Hoque M.O., Rosenbaum E., Westra W.H., Xing M., Ladenson P., Zeiger M.A., Sidransky Dand Umbricht C.B. Quantitative assessment of promoter methylation profiles in thyroid neoplasms // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2005. – Vol.90. – P. 4011-4018.
18. 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. Gene expression and functional evidence of epithelial-to-mesenchymal transition in papillary thyroid carcinoma invasion // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2007. – Vol.104. – P. 2803-2808.
19. Brecelj E., Frkovic Grazio S., Auersperg M., Bracko M. Prognostic value of E-cadherin expression in thyroid follicular carcinoma // *Eur. J. Surg. Oncol.* – 2005. – Vol.31. p- P. 544-548.
20. Rocha A.S., Soares P., Fonseca E., Cameselle-Teijeiro J., Oliveira M. Cand Sobrinho-Simoes M. E-cadherin loss rather than beta-catenin alterations is a common feature of poorly differentiated thyroid carcinomas // *Histopathology.* – 2003. – Vol.42. – P. 580-587.
21. Graff J.R., Gabrielson E., Fujii H., Baylin S.B., Herman J.G. Methylation patterns of the E-cadherin 5' CpG island are unstable and reflect the dynamic, heterogeneous loss of E-cadherin expression during metastatic progression // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol.275. – P. 2727-2732.
22. Gupta A., Deshpande C.G., Badve S. Role of E-cadherins in development of lymphatic tumor emboli // *Cancer.* – 2003. – Vol.97. – P. 2341-2347.
23. Batistatou A., Charalabopoulos A.K., Scopa C.D., Nakanishi Y., Kappas A., Hirohashi S., Agnantis N.J., Charalabopoulos K. Expression patterns of dysadherin and E-cadherin in lymph node metastases of colorectal carcinoma // *Virchows Arch.* – 2006. – Vol.448. – P. 763-767.
24. Friedl P., Noble P.B., Walton P.A., Laird D.W., Chauvin P.J., Tabah R.J., Black Mand Zanker K.S.

- Migration of coordinated cell clusters in mesenchymal and epithelial cancer explants in vitro // *Cancer Res.* – 1995. – Vol.55. – P. 4557-4560.
25. *Nabeshima K., Moriyama T., Asada Y., Komada N., Inoue T., Kataoka H., Sumiyoshi A and Koono M.* Ultrastructural study of TPA-induced cell motility: human well-differentiated rectal adenocarcinoma cells move as coherent sheets via localized modulation of cell-cell adhesion // *Clin. Exp. Metastasis.* – 1995. – Vol.13. – P. 499-508.
 26. *Brandt B., Junker R., Griwatz C., Heidl S., Brinkmann O., Semjonow A., Assmann G., Zanker K.S.* Isolation of prostate-derived single cells and cell clusters from human peripheral blood // *Cancer Res.* – 1996. – Vol.56. – P. 4556-4561.

РЕЗЮМЕ

Роль экспрессии Е-кадгерина в процессе инвазии папиллярного рака щитовидной железы

В.Г. Хоперия, А.С. Ларин, В.В. Васько

С целью изучения мезенхимальных свойств клеток инвазивного рака щитовидной железы (РЩЖ) в региональных метастазах исследованы метилирование и экспрессия Е-кадгерина на гистологических препаратах 66 случаев папиллярного РЩЖ и 34 соответствующих лимфатических узлов с метастазами. Гиперметилирование промотора гена Е-кадгерина выявлено в 39,3% случаев, потеря экспрессии Е-кадгерина коррелировала с лимфоцитарной инфильтрацией, признаками экстраорганной инвазии и метастазами в лимфоузлах. Статус метилирования Е-кадгерина был идентичным в 60% первичных опухолей и соответствующих метастазов. Усиление экспрессии Е-кадгерина ассоциировалось с утратой эпигенетических ингибиторов в метастазах. Гиперметилирование Е-кадгерина обнаружено в клеточных линиях РЩЖ с мезенхимальными морфологическими признаками. Потеря экспрессии Е-кадгерина в этих клетках коррелировала с высокой способностью к миграции. Ингибирование RAS/ERK или PI3K/AKT сигналов привело к уменьшению миграционной способности этих клеток, но не вызвало экспрессии Е-кадгерина. В клетках с эпителиальными морфологическими признаками воздействие фторбол-эфиром или фактором некроза опухоли (ФНО- α) приводило к транслокации мембранного Е-кадгерина в цитоплазму и индукции миграции. Не обнаружено изменения статуса метилирования промотора Е-кадгерина и экспрессии Е-кадгерина под

действием ФНО- α . Таким образом, в процессе метастазирования РЩЖ обнаружено динамические изменения метилирования Е-кадгерина. Эпигенетические механизмы и влияние ФНО- α являются независимыми факторами регуляции экспрессии и локализации Е-кадгерина. Эти механизмы могут играть роль в индукции ЭМТ в первичных опухолях, а также в изменении мезенхимального фенотипа на эпителиальный в метастазах.

Ключевые слова: рак щитовидной железы, Е-кадгерин, метилирование, метастазы.

SUMMARY

The role of E-cadherin expression in invasion of papillary thyroid cancer

V. Khoperia, O. Larin, V. Vasko

To determine whether the mesenchymal feature of invasive cancer cells is maintained in metastatic sites, we examined E-cadherin methylation and E-cadherin expression in 66 papillary thyroid cancer (PTC) samples and in 34 corresponding lymph node metastases (LNM). Hypermethylation of the E-cadherin gene promoter was detected in 39.3% of the PTCs, and loss of E-cadherin expression correlated with lymphocytic infiltration, extrathyroidal invasion and the presence of metastases. Comparing primary PTCs to the corresponding LNM, E-cadherin methylation status was identical in 60% of the cases. Loss of epigenetic silencing in LNM was associated with a gain of E-cadherin expression. Hypermethylation of the E-cadherin gene promoter was detected in thyroid cancer cell lines with mesenchymal-like morphology. Loss of E-cadherin expression in these cells correlated with high migratory ability. Inhibition of RAS/ERK or PI3K/AKT signaling decreased the migratory ability of these cells but did not induce E-cadherin expression. In the cells with epithelial-like morphology, treatments with phorbol ester or tumor necrosis factor (TNF)- α resulted in translocation of membranous E-cadherin to the cytoplasm and induction of migration. E-cadherin promoter methylation status and E-cadherin expression were not affected by TNF. Together, dynamic changes in E-cadherin methylation occur during metastatic progression in thyroid cancer. Epigenetic mechanisms and TNF-inducible signaling independently contribute to the regulation of E-cadherin expression and localization. These mechanisms may play a role in the induction of EMT in primary tumors and in the conversion from the mesenchymal to the epithelial phenotype in metastases.

Key words: thyroid, cancer, E-cadherin, methylation, metastasis.

Дата надходження до редакції 15.01.2012 р.