

roendocrine network, which modulate the gonadotrophic axis activity. The aim of this study was to investigate the role of intracerebroventricular obestatin infusion on the activity of the gonadoliberein (GnRH) neurons activity.

The experiment was performed on peripubertal Polish Merino sheep (n=24). Animals were divided into 2 groups: control (Ringer-Lock solution infusions; n=12) and experimental (obestatin infusion, 25µl/120µl/h; n=12). Infusions were performed over three consecutive days; blood samples were collected on day 0 and day 3. After the experiment, the animals were slaughtered, and the chosen brain tissue was preserved for IHC and Real Time RT-qPCR analysis.

It was also shown that exogenous obestatin changes the selected gene expression of GnRH pulse generator, decreases the secretory activity of GnRH neurons, resulting from the inhibition of GnRH release from median eminence terminal nerves, and also decreases the GnRH receptor gene expression in pituitary. On the basis of the obtained results it can be concluded that obestatin may be involved in the modulation of reproduction processes in animals at the level of the central nervous system. However, the mechanism of its action requires further research, especially identifying the obestatin receptor itself.

KEYWORDS

Obestatin, gonadoliberein, central nervous system.

МОЖЕТ ЛИ ОБЕСТАТИН МОДУЛИРОВАТЬ ГОНАДОЛИБЕРИН-ГОРМОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙРОНОВ?

M. Szlis, J. Polkowska, A. Wójcik-Gładysz

Килановский институт физиологии и питания животных
Польской академии наук, Варшава, Польша

Обестатин — анорексигенный пептид, действующий на центральную нервную систему (ЦНС) и на периферические нервы, может осуществлять нейроэндокринную функцию, которая модулирует гонадотрофическую активность аксонов.

Цель исследования — изучить действие интрацеребровентрикулярной инфузии обестатина на гонадolibериную активность нейронов.

Эксперимент был проведен на польских овцах Мерино в перипубертате (n=24). Животные были разделены на 2 группы: 1 — контрольная (инфузии раствора Рингера—Лока; n=12) и экспериментальная (инфузии обестатина, 25/120µl/h; n=12). Инфузии проводились в течение 3 дней подряд; образцы крови взяли на 0 и 3-й день. После эксперимента животные были забиты, и выбранные образцы ткани головного мозга были сохранены для иммуногистохимического анализа и количественной ПЦР в режиме реального времени.

Было показано, что экзогенный обестатин выборочно изменяет экспрессию генов генератора импульсов гонадolibерина, снижает секреторную активность гонадolibерина нейронами в результате ингибирования высвобождения гормона из терминальных нервов срединного возвышения гипоталамуса и также снижает экспрессию генов рецептора гонадolibерина в гипофизе. На основании полученных результатов можно заключить, что обестатин может быть вовлеченным в модуляцию процессов репродукции у животных на уровне ЦНС. Однако механизм его действия требует дальней-

шего изучения, а именно идентификация рецепторов обестатина.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

Обестатин, гонадolibейн, центральная нервная система.

★ ★ ★

doi: 10.14341/probl201662550-51

MIR-30A AND LIN28B CONFORM A DOUBLE- NEGATIVE FEEDBACK LOOP REGULATED BY PI3K MODULATING THYROID CANCER PROGRESSION

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

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

²Hospital Universitario de Móstoles, Мадрид, Испания

³Harvard Medical School, Бостон, США

Background. Our recent results showed that tumor suppressor miR-30a is firmly downregulated in Thyroid carcinomas. On the other hand, recent studies showed RNA- and DNA-binding proteins LIN28B and HMGA2 induce EMT, thus playing an important role in dedifferentiation and cancer malignification. Finally, latterly several authors agreed on the importance of a robust activation of PI3K for thyroid cancer emergency and progression.

Aim — to study the link between the emergency of LIN28B and HMGA2, miR-30a silencing and PI3K hyperactivation, and to determine their effect on thyroid cancer progression.

Material and methods. MiRNA targets computational predictions were performed with MiRanda algorithm. LIN28B and miR-30a expression vectors were transfected in ATC derived and normal thyroid cell lines; mRNA and protein levels were determined by qPCR, Luciferase and Western Blot. Invasion, proliferation and cell cycle assays were performed in Transwell, cell counter, and FACScan respectively.

Results. MiRanda algorithm identified multiple miR30a recognition elements in all LIN28B, HMGA2 and PI3K effectors. LIN28B expression correlated with PI3K activating mutations in ATC derived cell lines. Overexpression of miR30a resulted in LIN28B, HMGA2, and several PI3K effectors silencing, and in an increase in p27(Kip) protein levels. Inversely, LIN28B overexpressing cells showed a decrease in miR30a levels and an increased expression of HMGA2 and PI3K effectors. The general outcome was a significant decrease in invasion and proliferation in miR-30a overexpressing cells and, conversely, an increase in these parameters by LIN28B.

Conclusions. These data suggest the existence of a PI3K regulated feedback with a double-negative loop between miR-30a and LIN28B. Here, PI3K activation acts to switch the steady states. Initially, high miR-30a levels repress LIN28B expression. After PI3K is activated, LIN28B is produced and miR-30a is repressed. This state reinforces PI3K hyperactivation. Thus, the feedback implements a tumoral gene expression shift, contributing to thyroid cancer progression.

KEYWORDS

Thyroid Cancer, MicroRNA-30a, Network Circuits, HMGA2, LIN28B, PI3K pathway.

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

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

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

²Hospital Universitario de Móstoles, Мадрид, Испания

³Harvard Medical School, Бостон, США

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

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

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

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

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

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

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

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

★ ★ ★

doi: 10.14341/probl201662551-52

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

C. Fernández Méndez, P. Santisteban

Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain

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

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

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

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

KEYWORDS

Mefiator TAZ, sodium iodide symporter, thyroid cells.