

На правах рукописи

ЕНИКЕЕВ АДЕЛЬ ДАМИРОВИЧ

**РОЛЬ БЕЛКОВ CRAVR И ДРУГИХ КОМПОНЕНТОВ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ
РЕТИНОВОЙ КИСЛОТЫ В РАЗВИТИИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК
К РЕТИНОВОЙ КИСЛОТЕ**

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва - 2024 г.

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор – академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, Стилиди Иван Сократович).

Научный руководитель:

доктор биологических наук

Чевкина Елена Максимовна

Официальные оппоненты:

Сергеева Наталья Сергеевна, доктор биологических наук, профессор, руководитель лаборатории прогноза консервативного лечения Московского научно-исследовательского онкологического института имени П.А. Герцена – филиала федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Татарский Виктор Вячеславович, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной онкобиологии федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук.

Ведущая организация:

федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр рентгенорадиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «19» сентября 2024 года в 14:00 часов на заседании диссертационного совета 21.1.032.01, созданного на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (115522, г. Москва Каширское шоссе, д.23).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (115522, г. Москва Каширское шоссе, д.24) и на сайте www.ronc.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2024 года.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

Кадагидзе Заира Григорьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень ее разработанности

Приобретение резистентности клеток к терапии является одной из важнейших проблем в лечении злокачественных опухолей. В отличие от многих синтетических противоопухолевых препаратов, ретиноевая кислота (РК) является природным соединением, внутриклеточные метаболиты которого (ретиноиды), являются важнейшими регуляторами эмбрионального развития, роста клеток и апоптоза. Внутриклеточные функции РК связаны со стимуляцией дифференцировки, проведением апоптотических сигналов и негативной регуляцией пролиферации. РК успешно применяется в клинической практике для терапии острого промиелоцитарного лейкоза. Активно предпринимаемые попытки использования ретиноидов в терапии других типов онкопатологий в настоящее время ограничены быстрым формированием резистентности, механизмы которой до сих пор остаются недостаточно изучены. В этом контексте растущий интерес вызывает группа белков, которые связывают РК в цитоплазме и во многом определяют ее дальнейшую судьбу, а также опосредуют ее внутриклеточные эффекты. Эти белки доставляют РК к ядерным рецепторам, а также, по-видимому, участвуют в регуляции ее биодоступности и метаболизма. Есть основания полагать, что они играют важную роль в приобретении резистентности клеток к РК, хотя до сих пор этот вопрос практически не исследовался. Представителями этой небольшой группы являются гомологи CRABP1 (cellular retinoic acid binding protein 1) и CRABP2. Роль этих белков в проведении ретиноевого сигналинга, формировании резистентности, а также в опухолевой прогрессии в целом, до сих пор мало понятны. Другие потенциальные механизмы резистентности могут быть связаны с изменением репертуара ядерных рецепторов, которые активируют транскрипцию различных ретиноид-респонсивных генов, а также с активацией катаболизма РК. Ситуацию дополнительно осложняет не так давно обнаруженная активность РК, связанная с нетранскрипционной активацией ряда белков, являющихся важнейшими регуляторами малигнизации клеток, включая MAP киназы ERK1/2 и p38MAPK, а также анти-апоптотическую киназу АКТ. Есть данные о том, что эта активность может усиливать злокачественный потенциал клеток и являться одним из механизмов формирования устойчивости клеток к РК.

Диссертационная работа направлена на изучение влияния РК на клетки опухолей различных нозологических типов и выявление факторов, определяющих чувствительность и резистентность злокачественных опухолей к действию РК. В работе выдвигаются и проверяются различные гипотезы о механизмах резистентности, исследуется значение отдельных участников ретиноевой

сигнализации в качестве потенциальных факторов резистентности. Особое внимание уделено исследованию роли белков CRABP в реализации активности РК, а также их участию в регуляции роста и пролиферации клеток и их чувствительности к РК. Работа направлена на решение важнейших задач, связанных с преодолением резистентности злокачественных опухолей к терапии на основе природных и синтетических ретиноидов.

Цель исследования

Выяснение факторов, участвующих в формировании резистентности опухолевых клеток к РК, и роли белков CRABP1 и CRABP2 в регуляции роста и чувствительности к РК клеток рака молочной железы.

Задачи исследования

1. Оценить уровни чувствительности к РК клеток опухолей различного происхождения, сравнить экспрессию белков CRABP1 и CRABP2 в РК-чувствительных и РК-резистентных клетках, выявить возможную связь продукции CRABP с РК-чувствительностью.

2. Получить экспериментальную модель, представленную клетками опухолей единого нозологического типа с варьирующей в широком диапазоне чувствительностью к РК. Определить механизм РК-зависимого подавления роста клеток.

3. Исследовать продукцию мРНК и белков CRABP1 и CRABP2 в клетках данной экспериментальной модели; оценить возможную взаимосвязь между двумя гомологами CRABP и выявить особенности их экспрессии в клетках с разным уровнем РК-чувствительности/резистентности.

4. Провести направленную модификацию экспрессии CRABP1 и CRABP2 (нокдаун и гиперэкспрессию) в клетках с исходно разной РК-чувствительностью/резистентностью. Оценить влияние каждого из гомологов на рост и РК-чувствительность клеток.

5. Исследовать экспрессию ядерных рецепторов РК, *RAR α* и *RAR β* , а также ферментов катаболизма РК, цитохромов *CYP26A1* и *CYP26B1*, в клетках полученной экспериментальной модели, выявить возможную ассоциацию активности данных участников ретиноевого сигналинга с РК-чувствительностью/резистентностью.

6. Проверить наличие эффекта краткосрочной РК-опосредуемой активации протеинкиназ ERK1/2 и АКТ (нетранскрипционная активность РК) и ее зависимость от РК-чувствительности клеток и эндогенной экспрессии CRABP1.

Методология и методы исследования

Влияние РК на характеристики роста опухолевых клеток оценивали с помощью инкубации клеток с ATRA (all-trans retinoic acid) в различных концентрациях и в течение разных временных интервалов. Анализ экспрессии мРНК исследуемых генов проводился методом ПЦР в реальном времени; анализ продукции белков – методом иммуноблотинга; анализ активности протеинкиназ – методом иммуноблотинга с использованием антител к фосфорилированным формам белков (активирующее фосфорилирование).

Основные подходы для определения функционального значения белков CRABP основаны на направленной модификации экспрессии каждого из гомологов, гиперэкспрессии и нокдауна. Для этого кодирующие последовательности генов *CRABP1* и *CRABP2* и последовательности, кодирующие предшественники малых шпилечных РНК (shRNA), были клонированы в ретровирусный вектор pLXSN и лентивирусный вектор pLKO.1primo соответственно. Получение производных сублиний с направленной модификацией экспрессии *CRABP1* и *CRABP2* проводилось с использованием методик ретровирусной и лентивирусной инфекции.

Анализ свойств клеток в культуре включал: анализ выживаемости и пролиферации (прямой подсчет в камере Горяева); апоптоза (коммерческий набор для анализа апоптоза с флуоресцентной детекцией аннексина V), анализ клеточного цикла с помощью проточной цитофлуориметрии.

Научная новизна

Впервые исследована роль двух основных белков, связывающих РК, CRABP1 и CRABP2, в чувствительности злокачественных клеток к РК и приобретении РК-резистентности. В том числе, показана связь экспрессии CRABP1 с чувствительностью к РК клеток различных нозологических типов опухолей. Также обнаружено, что в клетках рака молочной железы (РМЖ) с разным уровнем РК-чувствительности экспрессия белков CRABP1 и CRABP2 сильно варьирует, в то время как полностью резистентные к РК клетки трижды негативного РМЖ характеризуются глубокой эпигенетической репрессией обоих гомологов. Впервые напрямую исследована роль каждого из гомологов CRABP в регуляции роста и РК-чувствительности клеток РМЖ. При этом обнаружено, что белки CRABP1 и CRABP2 оказывают противоположное влияние на обе изучаемые характеристики, причем направленность этого влияния зависит от исходного уровня РК-чувствительности клеток и утрачивается в полностью РК-резистентных клетках. Более того, впервые обнаружена корреляция между экспрессией двух гомологов и их функциональная связь, а именно, CRABP2-зависимая регуляция CRABP1. Кроме того, впервые проведенное на широкой панели клеток РМЖ исследование экспрессии генов-участников внутриклеточной ретиноевой

сигнализации выявило корреляцию экспрессии ядерных рецепторов РК, *RAR α* и *RAR β* , а также цитохромов *CYP26A1* и *CYP26B1* с РК-чувствительностью/резистентностью. Помимо этого, с использованием клеток различного происхождения в работе подтверждена ранее мало изученная РК-зависимая активация важнейших в аспекте канцерогенеза сигнальных молекул, протеинкиназ ERK1/2 и АКТ.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные в исследовании результаты имеют большое теоретическое значение как в отношении понимания путей реализации внутриклеточной активности ретиноевой кислоты, так и механизмов формирования резистентности к действию РК клетками злокачественных опухолей. Результаты работы имеют и практическую значимость для оценки РК-чувствительности опухолевых клеток и выбора терапии, а также для разработки методов терапии солидных опухолей на основе РК и синтетических ретиноидов. Полученные данные о механизмах формирования устойчивости к действию РК способствуют созданию новой тактики применения РК в сочетании с терапевтическими агентами, подавляющими формирование РК-резистентности.

Личный вклад

Автор самостоятельно провел тщательный анализ научной литературы по теме диссертации, изучил степень разработанности проблемы, принимал непосредственное участие в постановке целей, задач и разработке дизайна исследования. Автором проведены экспериментальная реализация плана исследования, анализ и обобщение полученных данных, подготовлены публикации, полностью отражающие все полученные результаты. Доклады по теме диссертации были представлены лично автором на всероссийских и международных научных конференциях.

Соответствие паспорту специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту научной специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия, направлению исследований п.2 «Исследования на молекулярном, клеточном и органном уровнях этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на современных достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии, биофизики и др.)».

Положения, выносимые на защиту

1. Белок CRABP1 на высоком уровне представлен в клетках РК-чувствительных опухолей (нейробластома), отсутствует в РК-резистентных (НМРЛ, глиобластома) и снижается при увеличении резистентности (рак яичника). В клетках РМЖ отсутствует строгая корреляция экспрессии CRABP1 с РК-чувствительностью, при этом максимально резистентные линии

характеризуются полной репрессией CRABP1, осуществляемой на нескольких уровнях эпигенетической регуляции.

2. Продукция белков CRABP1 и CRABP2 коррелирует между собой в клетках различного происхождения и связана с наличием регуляции, при которой CRABP2 является регулятором продукции CRABP1.

3. В РК-чувствительных клетках РМЖ CRABP1 стимулирует, а CRABP2 подавляет рост и выживание в присутствии АТРА, в средне-резистентных роль гомологов меняется на противоположную, а в максимально резистентных оба белка не влияют на исследуемые характеристики.

4. РК-резистентные РМЖ характеризуются достоверным снижением экспрессии рецептора *RAR α* , повышением *RAR β* и снижением активации цитохромов *CYP26A1* и *CYP26B1* в ответ на ретиноевую кислоту.

5. РК-зависимая активация протеинкиназ ERK1/2 и АКТ, соответствующая нетранскрипционной активности РК, обнаружена в опухолевых клетках различного происхождения, не связана с РК-чувствительностью и экспрессией CRABP1.

Внедрение результатов исследования

Разработанная методика анализа чувствительности опухолевых клеток к РК используется в научно-исследовательской работе НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Полученные генно-модифицированные линии описаны в опубликованных научных статьях, доступных для отечественных и зарубежных исследователей. Экспериментально-практический материал, полученный в работе, вносит существенный вклад в понимание механизмов резистентности к РК опухолевых клеток рака молочной железы. Полученные данные о роли белков CRABP, а также других факторов РК чувствительности/резистентности создают предпосылки для практических исследований, направленных на повышение эффективности противоопухолевых препаратов на основе ретиноидов.

Апробация

Апробация диссертации состоялась 19 января 2024 года на совместной научной конференции лаборатории регуляции клеточных и вирусных онкогенов, отдела химического канцерогенеза, лаборатории механизмов канцерогенеза, лаборатории цитогенетики, лаборатории молекулярной биологии вирусов, лаборатории молекулярной эндокринологии НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Результаты исследования были представлены на 7 научных конференциях: II, III, V-VII Всероссийская конференция по молекулярной онкологии (Москва, Россия, 2016 г., 2017 г., 2019 г., 2021 г., 2022 г.), 22 Международный симпозиум имени Чарльза Гейдельбергера по изучению рака (Томск, Россия, 2018 г.), 12-ая международная конференция «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, Россия).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 7 работ, из них 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России, 7 тезисов в материалах научных конференций.

Объем и структура работы

Диссертационная работа изложена на 135 страницах машинописного текста, состоит из введения, литературного обзора, материалов и методов, результатов, обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы. Список литературы включает 255 источника. Текст иллюстрирован 6 таблицами и 30 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В качестве экспериментальных моделей использовались следующие клеточные линии: H460, A549, H1299 – линии немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ); SK-N-AS, SH-SY-5Y, IMR-32 – нейробластомы; LN229, U87 – глиобластомы; OVCAR-3, OVCAR-4, OVCAR-8, SK-OV-3, EFO-21 – рака яичника (РЯ). Большая часть работы была выполнена с использованием клеточных линий РМЖ различных молекулярных подтипов: MCF7, T47D – люминальный А; SKBR3, HCC1954, MDA-MB-453 – HER2-подтип; HCC1937, MDA-MB-468, MDA-MB-231, HBL100 – тройной негативный подтип. В качестве условно нормальных клеток ткани молочной железы была использована линия MCF10A.

Для получения ретро- и лентивирусных частиц использовались линии эпителиальных клеток GP-293 («Clontech», США) и 293FT («Invitrogen», США) (производные линии HEK-293 – линии эмбриональных клеток почки человека).

Для гиперэкспрессии *CRABP1/2* проводили трансфекцию клеток GP-293 с использованием ретровирусного вектора pLXSN («Clontech», США) («пустой» либо с клонированной кодирующей последовательностью

	(cds	CRABP1:
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_004378.3?from=77&to=490,	cgs	CRABP2:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_001878.4?from=138&to=554)), и плазмиду pVSVG («Clontech», США). Для повышения эффективности трансфекции использовали липофектамин 2000 («Lipofectamine 2000™ Reagent, Invitrogen», США) или реагент Polyfect («Qiagen», Германия), согласно протоколу производителя. Инфекцию целевых опухолевых клеток псевдовиральными частицами проводили в течение 3-х суток с последующим отбором на антибиотике генитицине (G418).

Для подавления эндогенной экспрессии *CRABP1/2* клетки 293FT трансфицировали лентивирусным вектором pLKO.1 puro («Addgene», США) («пустой» либо содержащий последовательности предшественников малых шпилечных РНК (sh1CRABP2 - TRCN0000021371, sh2CRABP2 - TRCN0000021370, sh10CRABP1 - TRCN0000059412, sh14CRABP1 - TRCN0000059409), pVSVG и пакующей плазмидой pCMV delta R8.2 («Addgene», США). В остальной процедуре трансфекции не отличалась от таковой в случае GP-293.

Проверку гиперэкспрессии и подавления эндогенной экспрессии *CRABP1/2* осуществляли с помощью секвенирования, рестрикции полученных конструкторов, а также методом ОТ-ПЦР в реальном времени.

Экспрессию белков и их фосфорилированных форм проводили методом иммуноблоттинга. Детекцию проводили с помощью следующих антител: первичные: Anti-CRABP1 кроличьи поликлональные (Sigma, HPA017203), Anti-CRABP2 кроличьи моноклональные (Sigma, HPA004135), Anti-pAKT (S473) кроличьи моноклональные (Cell Signalling, 4060S), Anti-pERK-1/2 (T202/Y204) мышьиные моноклональные (Cell Signalling, 9106S), Anti-beta-actin кроличьи поликлональные (Abcam, ab8227), вторичные: Anti-rabbit козы поликлональные, конъюгированные с пероксидазой хрена (Cell Signalling, 29902), Anti-mouse козы поликлональные, конъюгированные с пероксидазой хрена (Abcam, ab5887).

Относительный уровень экспрессии мРНК различных генов регистрировали с помощью ОТ-ПЦР-РВ, разницу вычисляли методом $\Delta\Delta C_t$. В каждом случае нормализацию проводили по количеству ПЦР-продукта гена *RPL27* (референсный ген). Используемые в работе праймеры к мРНК генов: *RPL27* (F: ACCGCTACCCCGCAAAGTG и R: CCCGTCGGGCCTTGCGTTTA), *CRABP1* (F: CTCAAGGCACTGGGTGTGAAC и R: TGTAGAACTGATCCCCGTCC), *CRABP2* (F: GGAGCTTCTGCTCACAGACC и R: GCCAGCAGTGGAGATCAAAC), *RAR α* (F: GGACATTGACCTCTGGGACA и R: AAGGTCATGGTGTCTCTGCTC), *RAR β* (F: GGACCTTGAGGAACCGACAA, R: ATGCTAGGACTGTGCTCTGC и Zond: AGACGACCCAGCAAGCCTCACATGT),

CYP26A1 (F: CCAGAAAGTGCGAGAAGAGC и R: GTCTTCAGAGCAACCCGAAA),
CYP26B1 (F: GCTGCATGATGAGTGAGGTG и R: CAGGGCAAGGACTACTTGGA).

Для оценки уровня метилирования гена *CRABP1* выделяли ДНК из клеток, проводили бисульфитную конверсию и пиросеквенирование с использованием праймеров: Biot-CRABP1_F1: biot-TTGAGGTATAATTGGGTTGGG, CRABP1_R1: RGCAARGAACACACTCTAAACT; CRABP1_F: GGAGGTTGAGGTATAATTGGGTT, Biot-CRABP1_R: Biot-TARGRGCCTTAAATCACTAAAA, CRABP1_S: GAGGTATAATTGGGTTGGGAGTTGA.

Для обработки клеток использовали полностью транс-ретиноевую кислоту, АТРА («Sigma», США), которую растворяли в ДМСО (диметилсульфоксид, «ПанЭко», Россия) для приготовления стокового раствора с концентрацией 10 мМ.

1. Исследование неканонической активности РК. Клеточные культуры высаживали на 60 мм чашки по 800 тыс. клеток на чашку. На следующий день среду заменяли на бессывороточную на 18 часов (голодание). Затем добавляли АТРА в концентрации 1 мкМ и инкубировали 0, 5, 15, 30, 60, 240 минут, после этого клетки лизировали, анализ белков проводили методом иммуноблоттинга.

2. Исследование влияния экспрессии *CRABP1/2* на устойчивость клеток к АТРА. Клетки высаживали на 35 мм чашки в количестве 25-300 тыс. на чашку в зависимости от клеточной линии. На следующий день клетки обрабатывали 0.1, 1, 10 мкМ АТРА – для РК-чувствительных линий, для РК-устойчивых клеток использовали 10, 50 и 100 мкМ АТРА. В качестве контроля использовали клетки, обработанные ДМСО в максимальной концентрации. Через 5 дней проводили анализ количества клеток с помощью прямого подсчета в камере Горяева.

3. Исследование влияния АТРА на продукцию *CYP26A1* и *CYP26B1*. Клетки высаживали в количестве 50-300 тысяч в зависимости от клеточной линии и культивировали в течение 5-ти суток в присутствии АТРА в диапазоне концентраций 0.1 – 100 мкМ. В качестве контроля использовали клетки, культивируемые с ДМСО в соответствующей концентрации. После этого клетки лизировали, анализ мРНК проводили методом ОТ-ПЦР-РВ.

В отдельных экспериментах для оценки влияния РК на активность пролиферации высчитывали разницу между количеством клеток в «нулевой» точке и по прошествии 5 дней инкубации с АТРА. Клетки высаживали на 35 мм чашки в количестве 25-300 тыс. в чашку в зависимости от клеточной линии, через 5 дней проводили анализ количества клеток с помощью прямого подсчета в камере Горяева.

Методы статистического анализа включали: t-критерий Стьюдента, 2-х факторный дисперсионный анализ ANOVA (в том числе с проведением линейного анализа трендов), критерий

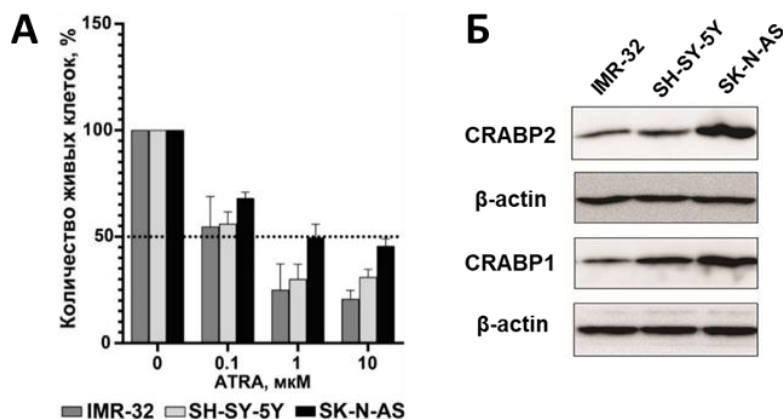
Манна-Уитни, критерий корреляции Спирмена. Статистически значимыми считали значения $p < 0.05$ (на рисунках обозначены как «*»), либо $p < 0.01$ (на рисунках обозначены как «**»). Все данные были получены в результате трех независимых экспериментов. Данные представлены в виде среднего \pm стандартного отклонения (SD). Для расчетов и построения графиков была использована программа GraphPad Prism 8.3 (GraphPad Software, США).

Результаты исследования

Исследование уровня чувствительности малигнизированных клеток к ретиноевой кислоте и возможной связи экспрессии белков CRABP с РК-резистентностью

Для оценки РК-чувствительности были использованы линии злокачественных опухолей глиобластомы, нейробластомы, НМРЛ и РЯ. Клетки обрабатывали АТРА в концентрации 0.1-100 мкМ в течение 120 часов. Затем анализировали количество живых клеток.

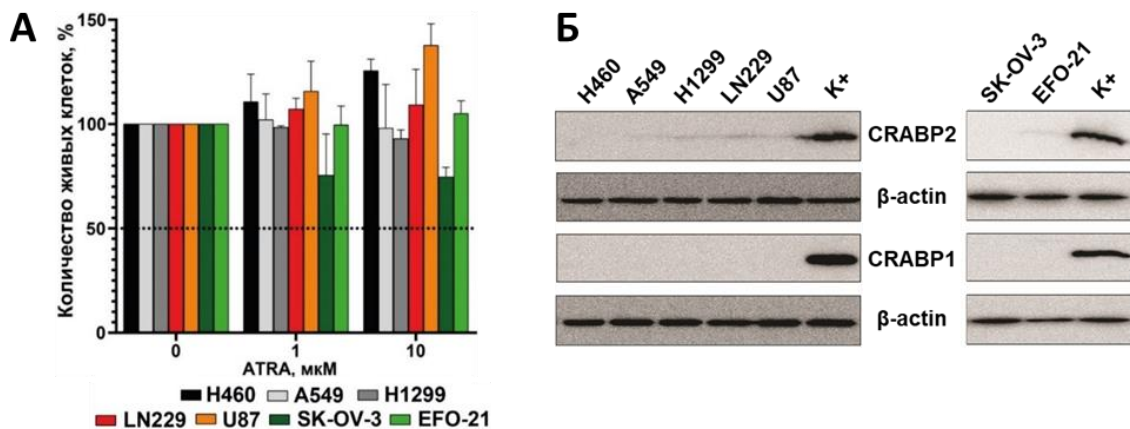
Все исследованные линии нейробластомы (SK-N-AS, SH-SY-5Y, IMR-32) продемонстрировали высокую чувствительность к АТРА. Количество живых клеток этих линий достоверно снижалось при обработке АТРА в концентрации 0.1 мкМ, а при 1 и 10 мкМ количество живых клеток составляло менее 50%. В дальнейшем такое пороговое значение (снижение клеток в два и более раза) было выбрано как биологически значимый критерий для деления клеток на группы по РК-чувствительности. Анализ экспрессии белков CRABP в этих клетках показал, что оба белка на высоком уровне экспрессируются во всех исследованных клетках нейробластом (Рисунок 1).



А – Клетки нейробластом оказались РК-чувствительными - продемонстрировали снижение пролиферации при концентрации АТРА 1 и 10 мкМ. **Б** – белки CRABP1 и CRABP2 высокоэкспрессированы в клетках нейробластом.

Рисунок 1 – Анализ резистентности клеток нейробластом к АТРА и экспрессии белков CRABP в них.

Клетки линий НМРЛ, глиобластомы и рака яичника оказались устойчивыми к действию АТРА – при обработке 1 и 10 мкМ количество живых клеток не снижалось. Анализ экспрессии белков CRABP в этих клетках показал, что во всех исследованных клетках оба белка CRABP представлены на низком уровне (в случае CRABP1 наблюдается максимальная разница) (Рисунок 2).



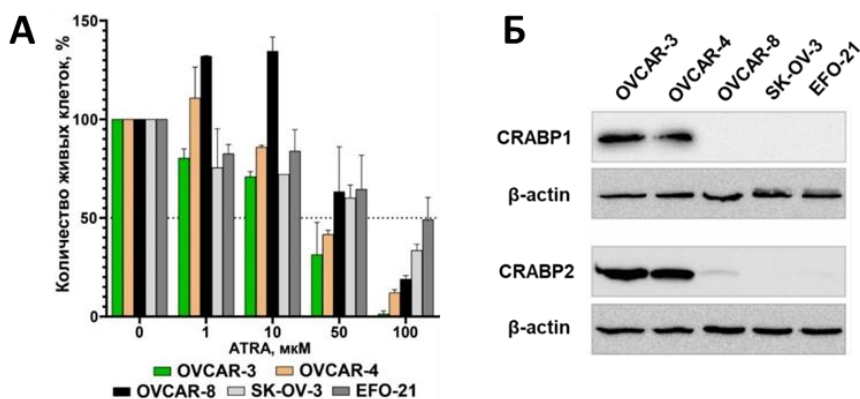
А – Клетки НМРЛ, глиобластомы и РЯ оказались РК-резистентными – их пролиферация не снижалась до порогового значения при добавлении 1 и 10 мкМ АТРА. **Б** – белки CRABP1 и CRABP2 низкоэкспрессированы в клетках НМРЛ, глиобластом и РЯ.

Рисунок 2 – Анализ резистентности клеток НМРЛ, глиобластомы и РЯ к АТРА и экспрессии белков CRABP

На основании полученных результатов мы предположили, что экспрессия белков CRABP может быть взаимосвязана между собой. Также мы предположили, что экспрессия CRABP1 связана с чувствительностью клеток к РК.

Для проверки обеих гипотез на первом этапе мы сравнили чувствительность к РК различных клеток рака яичника, так как по данным иммуноблоттинга в некоторых линиях присутствует CRABP1. Для анализа РК-резистентности клеток рака яичника была использована панель клеточных линий: OVCAR-3, OVCAR-4, OVCAR-8, SK-OV-3, EFO-21. Обработка этих линий АТРА в различных концентрациях (1, 10, 50, 100 мкМ) подтвердила, что все исследованные клетки характеризуются РК-резистентностью – количество живых клеток при 1 и 10 мкМ снижалось незначительно, значимый эффект снижения количества клеток (до 50% и ниже, ($p < 0.05$)) наблюдался при обработке 50 и 100 мкМ АТРА (Рисунок 3).

Таким образом, в рамках сравнения клеточных линий даже РК-резистентного типа опухолей подтверждаются обе гипотезы - о связи CRABP1 с РК-чувствительностью и о корреляции продукции белков CRABP1 и CRABP2 между собой.



А – Клетки РЯ оказались РК-резистентными - продемонстрировали снижение пролиферации при концентрации АТРА 1 и 10 мкМ. Однако уровень резистентности варьирует. **Б** – белки CRABP1 и CRABP2 высокоэкспрессированы в менее резистентных клетках РЯ.

Рисунок 3 – Анализ резистентности клеток РЯ к АТРА и экспрессии белков CRABP

Для более детальной проверки обеих указанных гипотез была выбрана экспериментальная модель РМЖ, так как данный тип опухолей является гетерогенным как по происхождению, так и по молекулярным характеристикам. Чувствительность к РК этих опухолей также сильно варьирует.

Проверка гипотезы о взаимосвязи экспрессии гомологов CRABP

Для проверки гипотезы о связи экспрессии белков CRABP между собой, мы провели нокдаун CRABP2 с использованием двух шпилечных конструкций в трех линиях РМЖ. Подавление CRABP2 во всех случаях привело к снижению экспрессии белка CRABP1 (Рисунок 4).

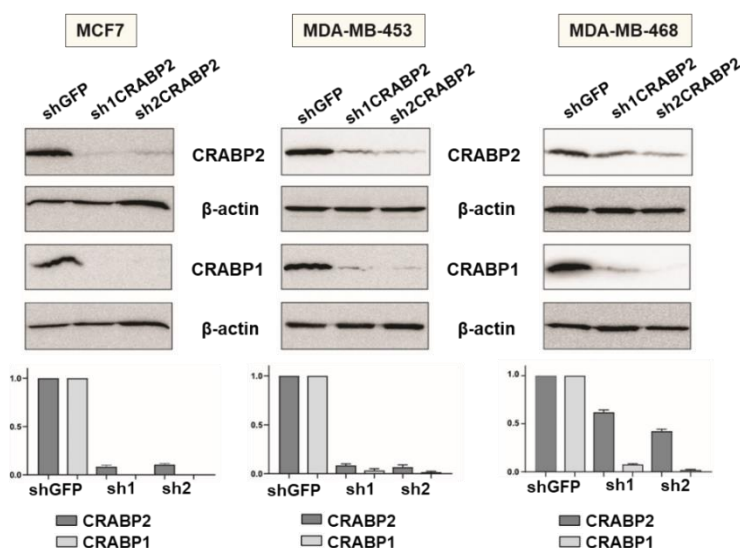
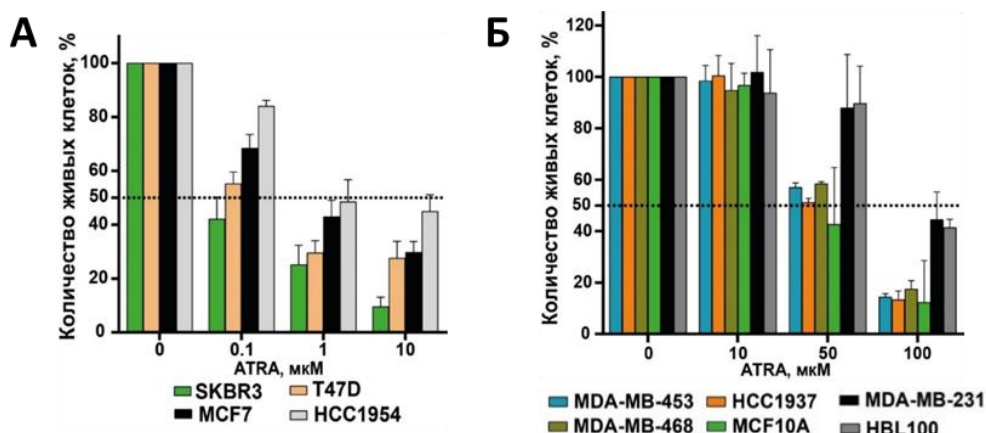


Рисунок 4 - Влияние нокдауна *CRABP2* на продукцию CRABP1 в линиях РМЖ

Таким образом, CRABP2 является вышестоящим (upstream) регулятором экспрессии белка CRABP1, что может являться дополнительным механизмом регуляции активности РК.

Сравнение чувствительности к ретиноевой кислоте клеток рака молочной железы и анализ продукции белков CRABP1 и CRABP2

Далее мы исследовали связь белков CRABP с РК-чувствительностью клеток РМЖ. Анализ резистентности клеток с использованием критерия 10 мкМ АТРА показал, что клетки РМЖ делятся на группы РК-чувствительных и РК-резистентных. Однако степень чувствительности/резистентности к РК варьировала. Так, РК-чувствительные линии делились на высоко- и средне-чувствительные, а РК-резистентные - на средне- и максимально резистентные (Рисунок 5). По нашим данным, АТРА оказывает преимущественно не цитотоксическое, а антипролиферативное действие. В клетках наблюдается задержка клеточного цикла в Go/G1 и незначительное увеличение клеток в позднем апоптозе-некрозе, в различной степени выраженное в разных клетках.



А – РК-чувствительные линии характеризовались снижением пролиферации при концентрации полумаксимального ингибирования АТРА до 10 мкМ. **Б** – РК-резистентные линии демонстрировали снижение пролиферации при концентрации АТРА от 50 мкМ и выше.

Рисунок 5 - Сравнение динамики пролиферации клеток РМЖ при инкубации с АТРА

Анализ продукции подтвердил наличие корреляции между экспрессией белков CRABP2 и CRABP1. В то же время строгой корреляции экспрессии CRABP1 с РК-резистентностью обнаружено не было, хотя в максимально резистентных линиях (как и в РЯ) CRABP1 отсутствует (Рисунок 6).

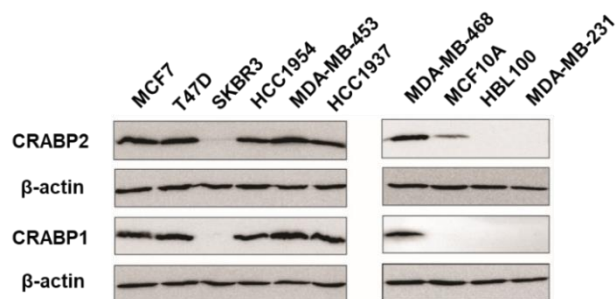
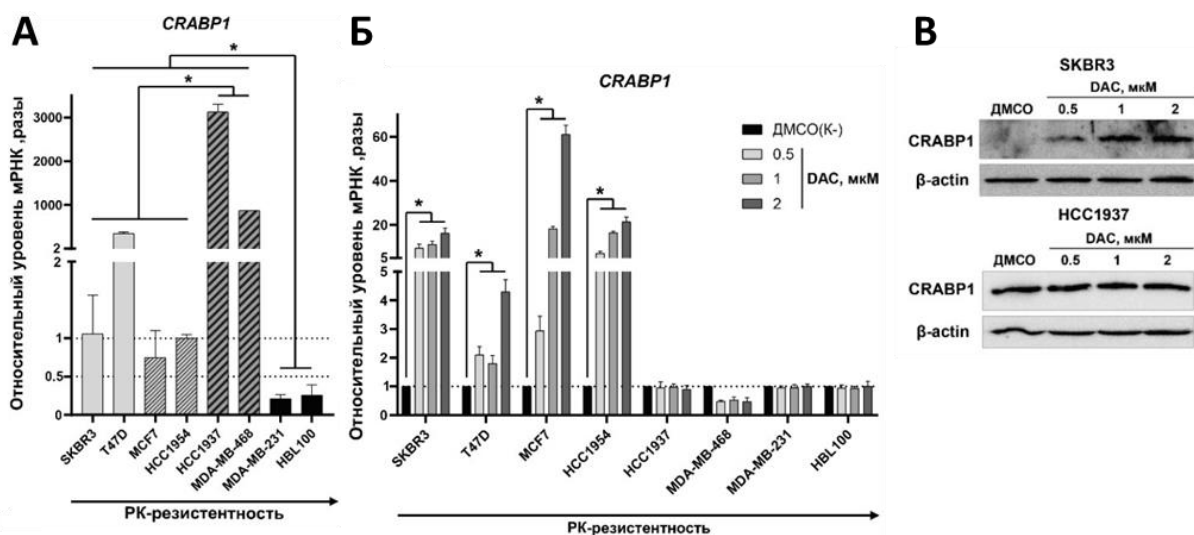


Рисунок 6 - Сравнение продукции белков CRABP1 и CRABP2 в линиях РМЖ с различной РК-чувствительностью

Анализ уровня мРНК *CRABP1* и *CRABP2* в линиях клеток рака молочной железы с различным уровнем чувствительности/резистентности к ретиноевой кислоте

В связи с тем, что нам не удалось выявить четкую корреляцию между экспрессией белка CRABP1 и РК-чувствительностью клеток РМЖ, мы попытались оценить возможную связь на уровне экспрессии мРНК *CRABP1*. Результаты анализа ожидаемо подтвердили, что в максимально РК-резистентных линиях MDA-MB-231 и HBL100 (с отсутствием белка CRABP1), мРНК *CRABP1* практически не детектируется, а в «средне РК-резистентных» клетках HCC1937 и MDA-MB-468 с высокой продукцией белка CRABP1 мРНК продуцировалась на максимальном уровне (Рисунок 7А).

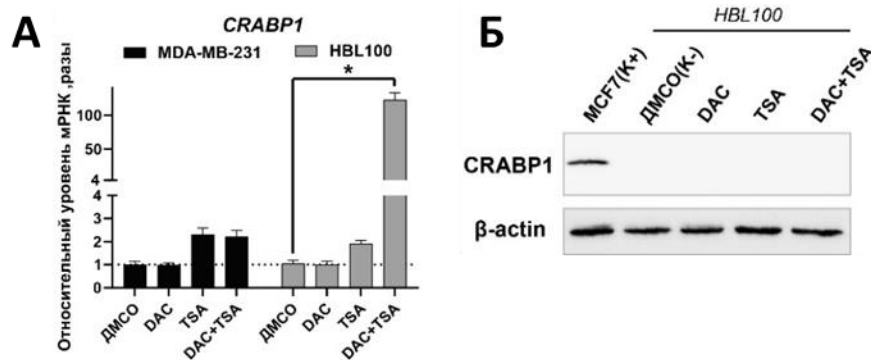


А – Базовый уровень экспрессии мРНК *CRABP1* в клетках РМЖ. **Б** - Уровень экспрессии мРНК *CRABP1* в клетках РМЖ после обработки DAC. **В** - Уровень экспрессии белка CRABP1 в клетках РМЖ после обработки DAC.

Рисунок 7 - Анализ базовой экспрессии CRABP1 и влияния деметилирования на экспрессию CRABP1 в линиях клеток РМЖ с разным уровнем РК-чувствительности.

В РК-чувствительных линиях экспрессия *CRABP1* была существенно ниже, причем, к нашему удивлению, в клетках MCF7 и HCC1954 при достаточно высоком уровне белка CRABP1 мРНК детектировалась на крайне низком уровне (значения Ct = 36 и более циклов).

Для того, чтобы понять, связаны ли обнаруженные различия в экспрессии *CRABP1* с метилированием гена, клетки обрабатывали деметилирующим агентом – 5-aza-deoxycytidine (DAC), ингибитором ДНК-метилтрансфераз. Во всех РК-чувствительных клетках (SKBR3, T47D, MCF7 и HCC1954) обработка привела к дозозависимому увеличению экспрессии *CRABP1* (Рисунок 7Б). В тех же линиях (включая SKBR3 с отсутствием продукции CRABP1) происходило и увеличение белка (Рисунок 7В). В то же время во всех РК-резистентных клетках (HCC1937, MDA-MB-468, MDA-MB-231 и HBL100) обработка DAC не повлияла на экспрессию *CRABP1*. Такие результаты указывают на то, что в полностью РК-резистентных клетках отсутствие экспрессии CRABP1 связано с более глубоким уровнем репрессии *CRABP1*. В качестве одного из возможных механизмов, обуславливающих эпигенетическое молчание *CRABP1* в максимально РК-резистентных клетках, мы исследовали деацетилирование гистонов, которое способствует конденсации нуклеосом и приводит к репрессии генов. Мы обнаружили, что обработка трихостатином А (TSA - ингибитором деацетилазы гистонов) приводит к крайне незначительной индукции экспрессии *CRABP1* (Ct=38-39 циклов) в обеих линиях (MDA-MB-231 и HBL100). Более того, даже сочетание воздействия DAC и TSA не приводит к дополнительному повышению экспрессии *CRABP1* в MDA-MB-231. Вместе с тем в клетках HBL100 данное сочетание привело к увеличению мРНК *CRABP1* более, чем в 100 раз (Рисунок 8А).



А – Уровень экспрессии мРНК *CRABP1*. Б – Уровень экспрессии белка CRABP1 в клетках HBL100.

Рисунок 8 - Анализ экспрессии CRABP1 в максимально резистентных клетках РМЖ с после обработки DAC и TSA.

Однако, как и в случае с DAC, инкубация клеток HBL100 с TSA или с DAC+TSA в комбинации не индуцировала продукцию белка CRABP1 (Рисунок 8Б). Для клеток MDA-MB-231 продукция белка CRABP1 при обработке клеток TSA или DAC+TSA также не детектировалась.

Исследование роли белков CRABP1 и CRABP2 в регуляции пролиферации и чувствительности к ретиноевой кислоте клеток рака молочной железы

Мы предположили, что связь CRABP с РК-чувствительностью является более сложной, и решили оценить роль каждого из гомологов впрямую. Поэтому далее мы провели направленную модификацию экспрессии *CRABP1* и *CRABP2* в клетках РМЖ для прямой оценки влияния экспрессии каждого из гомологов на РК-чувствительность, а также на скорость роста в стандартных условиях (показатель уровня малигнизации) клеток РМЖ с различным исходным уровнем РК-чувствительности и различным гормональным статусом. Для этого в клетках с высоким базовым уровнем мРНК мы проводили нокдаун, а в клетках с изначально низким уровнем – гиперэкспрессию.

На первом этапе мы исследовали РК-чувствительные клетки РМЖ. Гиперэкспрессия CRABP1 в обеих линиях, SKBR3 и MCF7, привела к повышению как пролиферации, так и РК-резистентности. Гиперэкспрессия CRABP2 в SKBR3 привела к противоположному эффекту – снижению пролиферации и РК-резистентности, а нокдаун CRABP2 в клетках MCF7 привел к повышению пролиферации и РК-резистентности – эффекту, аналогичному гиперэкспрессии CRABP1 в эти клетки (Рисунок 9).

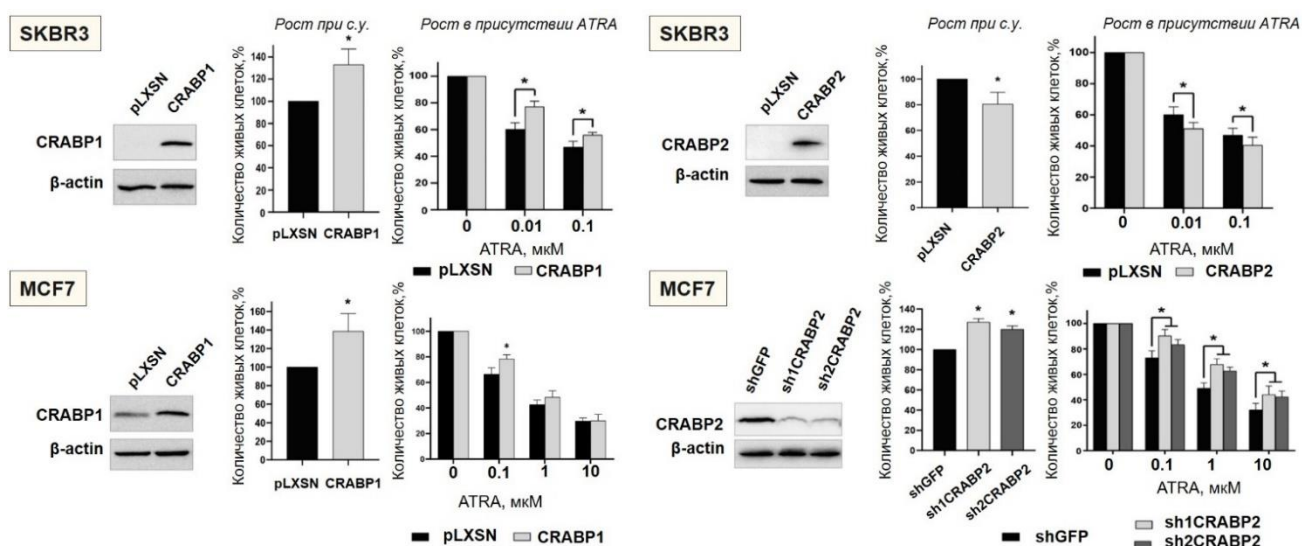


Рисунок 9 - в РК-чувствительных клетках РМЖ (MCF7 и SKBR3) CRABP1 повышает пролиферацию и РК-резистентность, а CRABP2 – подавляет данные свойства.

Далее мы исследовали влияние обоих гомологов CRABP на те же показатели роста и выживаемости более резистентных клеток, которые относятся к трижды негативному типу РМЖ - линии HCC1937 и MDA-MB-468. Выбранные линии обладают высоким базовым уровнем экспрессии обоих гомологов CRABP, что позволяет провести нокдаун каждого из генов, а так же наиболее высоким потенциалом изменения РК-чувствительности как в сторону понижения, так и в сторону повышения.

В обеих клеточных линиях нокдаун CRABP1 привел к повышению пролиферации и РК-резистентности, а подавление CRABP2 привело к обратному эффекту – снижению пролиферации и РК-резистентности (Рисунок 10).

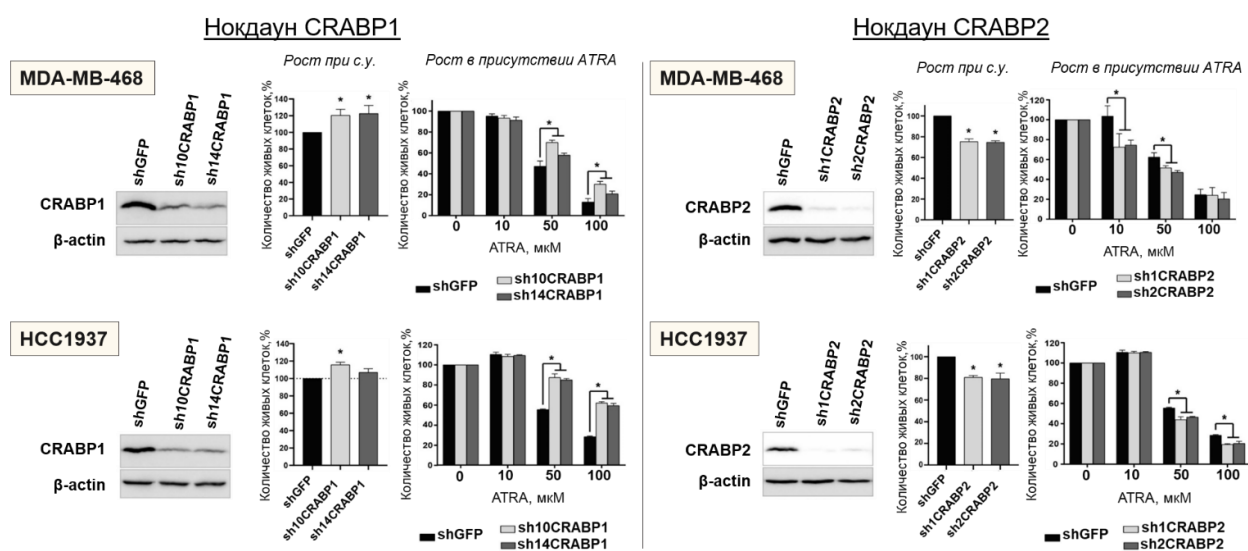


Рисунок 10 - в средне РК-резистентных клетках РМЖ (HCC1937 и MDA-MB-468) CRABP1 подавляет пролиферацию и РК-резистентность, а CRABP2 – стимулируют данные характеристики.

То есть в средне-резистентных клетках РМЖ роль белков меняется на противоположную: CRABP1 подавляет рост и РК-резистентность, а CRABP2 стимулирует эти характеристики. При этом роль белков также противонаправлена друг другу.

В связи с полученными результатами мы далее оценили влияние каждого из гомологов на исследуемые характеристики «максимально РК-резистентных» линий MDA-MB-231 и HBL100. Гиперэкспрессия *CRABP1* и *CRABP2* в клетках MDA-MB-231 и HBL100 не привела к изменениям роста и РК-резистентности (Рисунок 24А). При этом важно отметить, что трансдукция *CRABP2*, в отличие от *CRABP1*, в клетках HBL100 не привела к продукции белка, несмотря на более чем 100-кратное увеличение уровня мРНК *CRABP2* (Рисунок 11). Аналогичное повышение уровня мРНК

CRABP1 наблюдалось ранее при обработке клеток HBL100 комбинацией TSA и DAC, которое так же не сопровождалось повышением уровня белка, что может свидетельствовать об активации механизмов посттранскрипционной репрессии обоих гомологов.

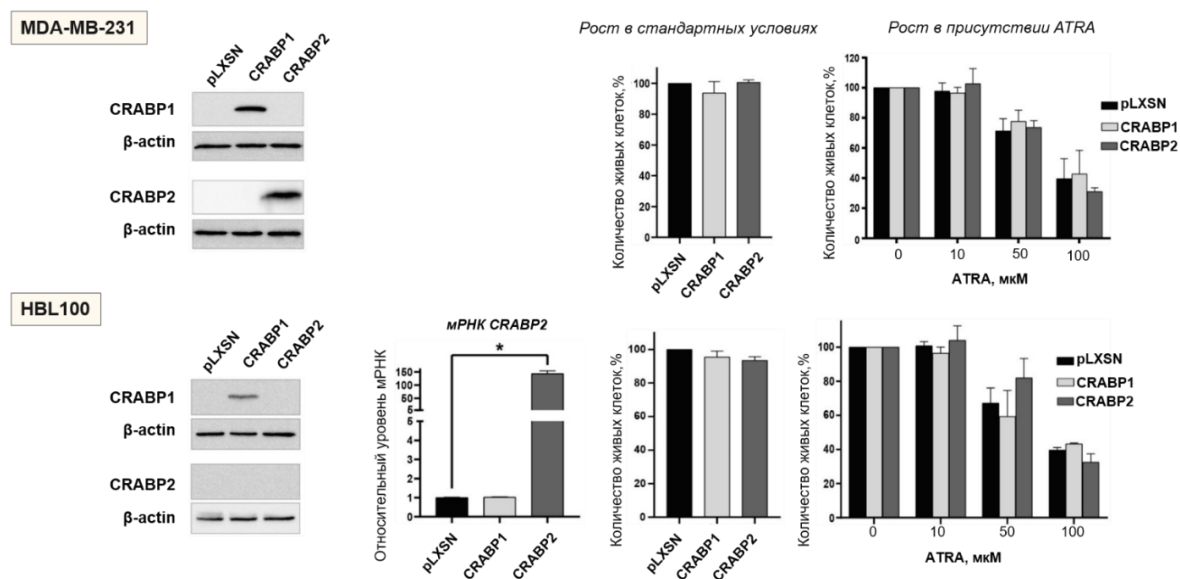


Рисунок 11 - Экзогенная экспрессия *CRABP* не влияет на пролиферацию и РК-чувствительность максимально РК-резистентных клеток MDA-MB-231 и HBL100

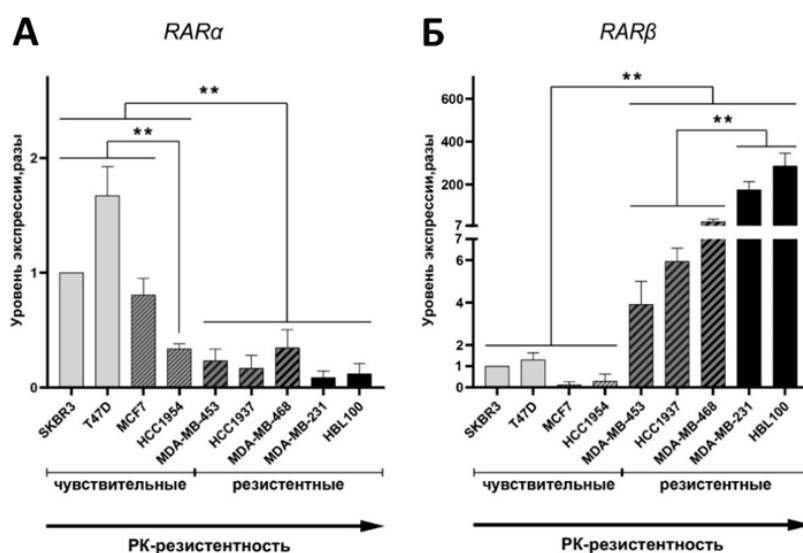
Также важно отметить, что гиперэкспрессия *CRABP2* как в клетках MDA-MB-231, так и в HBL100, не повлияла на продукцию *CRABP1* и наоборот. Такие результаты свидетельствуют об утрате максимально РК-резистентными клетками взаимосвязи между экспрессией двух гомологов *CRABP*, показанной нами для клеток РК-чувствительных и средне-резистентных линий.

Анализ экспрессии рецепторов *RARα* и *RARβ* в клетках рака молочной железы

Наряду с исследованными факторами, потенциально регулирующими РК-чувствительность, в формировании РК-резистентности могут быть задействованы и другие участники ретинового сигналинга, в первую очередь, ядерные рецепторы РК (прежде всего *RARα* и *RARβ*). Для изучения этого вопроса мы провели сравнительный анализ экспрессии *RARα* и *RARβ* в той же панели клеточных линий РМЖ. По результатам анализа, РК-чувствительные клетки обладали более высоким уровнем мРНК *RARα* по сравнению с РК-резистентными (Рисунок 25). Более того, максимально высокий уровень мРНК *RARα* был детектирован в наиболее чувствительных линиях T47D и SKBR3, а линия HCC1954, показавшая наименьшее снижение пролиферации при обработке ATRA среди РК-чувствительных клеток, характеризовалась и значимо меньшим уровнем

экспрессии *RARα* по сравнению с другими РК-чувствительными линиями. Была также подтверждена гипотеза о наличии значимого тренда (линейной зависимости уменьшения экспрессии *RARα* от снижения РК-чувствительности) в группе РК-чувствительных линий. Таким образом, в клетках РМЖ экспрессия *RARα* снижается по мере увеличения уровня РК-резистентности (Рисунок 12А).

Анализ экспрессии мРНК *RARβ* в клетках РМЖ показал обратную картину: уровень *RARβ* в РК-чувствительных клетках был значительно ниже, чем в РК-резистентных. Более того, в группе устойчивых линий максимально РК-резистентные клетки (MDA-MB-231 и HBL100) характеризовались наивысшей экспрессией *RARβ*. Таким образом, экспрессия *RARβ* в клетках РМЖ изменяется сонаправленно с уровнем РК-резистентности (Рисунок 12Б).



А. Относительный уровень экспрессии мРНК *RARα* в клетках РМЖ. **Б.** Относительный уровень экспрессии мРНК *RARβ* в клетках РМЖ. ** - $p < 0.01$

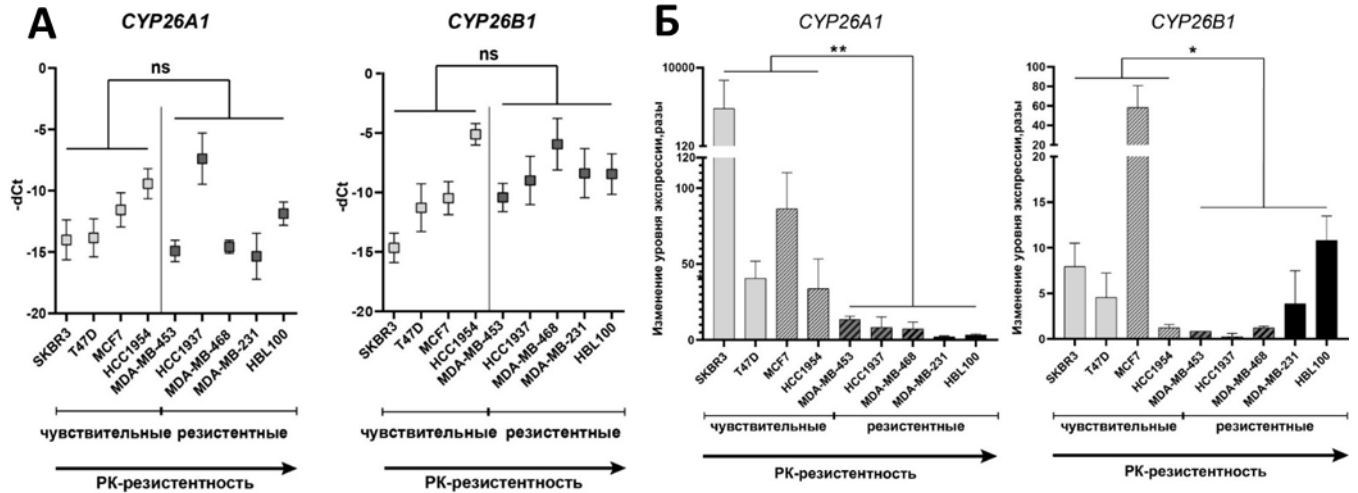
Рисунок 12 – Экспрессия *RARα* связана с РК-чувствительностью, а экспрессия *RARβ* – с РК-резистентностью клеток РМЖ

В целом, в ряду клеток РМЖ с повышением уровня РК-резистентности (обозначена стрелкой на рисунке 12) происходит снижение уровня *RARα* и повышение уровня *RARβ*. Такое противоположное изменение экспрессии рецепторов RAR может быть одним из механизмов формирования РК-резистентности клеток РМЖ.

Анализ экспрессии цитохромов *CYP26A1* и *CYP26B1* в клетках рака молочной железы

Для проверки гипотезы о связи РК-резистентности с экспрессией основных ферментов, ответственных за ее деградацию, был проведен анализ уровней мРНК *CYP26A1* и *CYP26B1* в клетках

той же панели линий РМЖ. Результаты анализа базового уровня экспрессии не выявили достоверных различий между группами РК-чувствительных и резистентных линий как для *CYP26A1*, так и для *CYP26B1* (Рисунок 13А).



А – Базовый уровень экспрессии *CYP26A1* и *CYP26B1*. **Б** - уровень экспрессии *CYP26A1* и *CYP26B1* после инкубации клеток с АТРА. * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$.

Рисунок 13 – уровень экспрессии мРНК *CYP26A1* и *CYP26B1* в клетках РМЖ с разным уровнем РК-чувствительности

Поскольку экспрессия цитохромов индуцируется в ответ на добавление субстрата, мы далее оценивали экспрессию *CYP26A1* и *CYP26B1* после инкубации с 1мкМ АТРА относительно базового уровня экспрессии. РК-чувствительные линии характеризовались значительно большей индукцией *CYP26A1* по сравнению с группой РК-резистентных линий. Это означает, что РК-чувствительные клетки способны эффективнее разлагать РК при увеличении ее внутриклеточной концентрации. В случае *CYP26B1* разница в индукции экспрессии была не настолько ярко выражена, как для *CYP26A1*, однако тоже была статистически значима (Рисунок 13Б).

Исследование неканонической активности ретиноевой кислоты

Затем мы исследовали нетранскрипционную активность РК, которая заключается в нетранскрипционной активации белков, включая ключевые сигнальные белки, вовлеченные в опухолевую прогрессию. По данным литературы такая активность, показанная лишь для некоторых клеток, может быть связана с РК-резистентностью и регулируется белком CRABP1. Для исследования выбрали РК-чувствительные клетки (нейробластомы – SK-N-AS, SH-SY-5Y) с высоким уровнем CRABP1 и РК-резистентные клетки (HMPЛ – H460, A549) с отсутствием CRABP1.

По результатам анализа был подтвержден эффект нетранскрипционной активности РК в отношении фосфорилировании протеинкиназ ERK1/2 (pThr202/Tyr204) и АКТ (pSer473) при кратковременной обработке АТРА на 5-30 минутах (Рисунок 14). Данный эффект показан как для РК-чувствительных, так и РК-резистентных клеток включая клетки с высокой экспрессией CRABP1 и с отсутствием экспрессии.

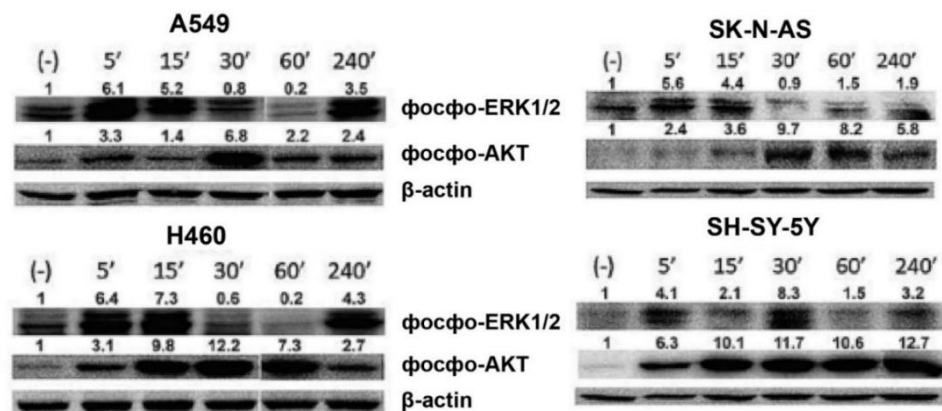


Рисунок 14 – Нетранскрипционная активность РК заключается в фосфорилировании киназ ERK1/2 и АКТ после кратковременной обработки клеток АТРА и обнаруживается как в РК-чувствительных, так и в РК-резистентных клетках.

Таким образом, эффект неканонической активности РК универсален и не связан с РК-резистентностью и экспрессией CRABP1. Различная кинетика РК-зависимого фосфорилирования данных киназ указывает на то, что их активация происходит с помощью различных сигнальных путей.

ВЫВОДЫ

1. CRABP1 на высоком уровне экспрессируется в клетках РК-чувствительных опухолей (нейробластомы) и отсутствует – в РК-резистентных (НМРЛ, глиобластомы); в клетках рака яичника продукция белка детектируется в наименее резистентных линиях.

2. В клетках РМЖ в зависимости от степени РК-чувствительности, CRABP1 либо исходно экспрессируется на высоком уровне, либо активируется при деметилировании гена, в то время как в наиболее резистентных линиях наблюдается полная репрессия *CRABP1*, реализуемая за счет нескольких механизмов эпигенетической регуляции.

3. Впервые показано наличие корреляции между продукцией белков CRABP1 и CRABP2, а также функциональной связи, при которой CRABP2 является регулятором продукции CRABP1.

4. Впервые показано, что белки CRABP оказывают противоположное влияние на рост и чувствительность к РК клеток РМЖ - в РК-чувствительных клетках CRABP1 стимулирует, а CRABP2 подавляет рост и выживание в присутствии АТРА, в более резистентных роль гомологов меняется на противоположную, а в максимально резистентных оба белка не влияют на исследуемые характеристики.

5. Обнаружена связь экспрессии *RAR α* с РК-чувствительностью, а *RAR β* – с РК-резистентностью клеток РМЖ.

6. РК-чувствительные клетки РМЖ характеризуются значимо более высоким уровнем активации цитохромов *CYP26A1* и *CYP26B1* в ответ на обработку ретиноевой кислотой.

7. Обнаружен эффект краткосрочной РК-зависимой активации протеинкиназ ERK1/2 и АКТ, соответствующий нетранскрипционной активности РК, в клетках НМПЛ и нейробластомы. Показано, что данный эффект не зависит от РК-чувствительности и экспрессии CRABP1.

Практические рекомендации

При выборе терапии рекомендуется проводить анализ уровня РК-чувствительности клеток и оценить возможность включения в схему лечения терапии на основе ретиноидов. Рекомендовано дальнейшее исследование рецепторов *RAR α* и *RAR β* : в качестве маркеров чувствительности опухолевых клеток к терапии на основе ретиноидов. Использование данных потенциальных маркеров позволит эффективно и быстро оценить целесообразность проведения терапии на основе ретиноидов. При выборе терапии на основе ретиноидов рекомендуется комплексная оценка факторов, обуславливающих формирование РК-резистентности, в частности, белков CRABP, ядерных рецепторов РК, цитохромов *CYP26A1* и *CYP26B1*.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Полученные данные расширяют современное представление о факторах и механизмах резистентности к ретиноевой кислоте клеток рака молочной железы, и позволяют определить дальнейшие перспективы разработки данной темы: 1) анализ вклада каждого из идентифицированных факторов на опухолевую прогрессию и устойчивость к РК клеток рака молочной железы и поиск потенциальных терапевтических мишеней; 2) исследование рецепторов *RAR α* и *RAR β* , а также ферментов катаболизма цитохромов *CYP26A1* и *CYP26B* в качестве потенциальных маркеров чувствительности клеток рака молочной железы к терапии на основе ретиноидов; 3) разработка новых подходов к лечению рака молочной железы с применением АТРА в комбинации с агентами, повышающими РК-чувствительность.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Enikeev, A.D.** Opposite Effects of CRABP1 and CRABP2 Homologs on Proliferation of Breast Cancer Cells and Their Sensitivity to Retinoic Acid / A.D. Enikeev, P.M. Abramov, D.S. Elkin, A. V. Komelkov, A.A. Beliaeva, D.M. Silantieva, E.M. Tchekvina // *Biochemistry (Moscow)*. – 2023. – Т.88. – №12. – С.2107-2124. **(Журнал ВАК)**
2. **Enikeev, A.D.** CRABP1 and CRABP2 Protein Levels Correlate with Each Other but Do Not Correlate with Sensitivity of Breast Cancer Cells to Retinoic Acid / A.D. Enikeev, A. V. Komelkov, M.E. Axelrod, S.A. Galetsky, S.A. Kuzmichev, E.M. Tchekvina // *Biochemistry (Moscow)*. – 2021. – Vol.86. – №2. – P.217-229. **(Журнал ВАК)**
3. Делекторская, В.В. Ядерная локализация белка, связывающего ретиноевую кислоту (CRABP1) ассоциирована со степенью злокачественности нейроэндокринных опухолей легкого / В.В. Делекторская, А.В. Комельков, И.Б. Зборовская, **А.Д. Еникеев**, В.М. Сафронова, Е.М. Чевкина // *Вопросы онкологии*. – 2017. – Т.63. – №6. – С.886-893. **(Журнал ВАК)**
4. **Еникеев, А.Д.** Резистентность клеток рака молочной железы к полностью трансретиноевой кислоте ассоциирована со снижением базального уровня экспрессии ядерного рецептора RAR α и индукции экспрессии цитохромов CYP26A1 и CYP26B1 / А.Д. Еникеев, А.В. Комельков, Н.В. Елкина, М.Е. Аксельрод, С.А. Кузьмичев, Е.М. Чевкина // *Успехи молекулярной онкологии*. – 2022. – Т.9. – №2. – С.66-78.
5. **Еникеев, А.Д.** Влияние экспрессии CRABP1 на пролиферацию и чувствительность к ретиноевой кислоте клеток рака молочной железы различного происхождения / А.Д. Еникеев, А.В. Комельков, М.Е. Аксельрод, С.А. Галецкий, Е.М. Чевкина // *Успехи молекулярной онкологии*. – 2020. – Т.7. – №4. – С.46-50.
6. **Еникеев, А.Д.** Неканоническая активность ретиноевой кислоты как возможный механизм формирования резистентности злокачественных клеток к ретиноидной терапии / А.Д. Еникеев, А.В. Комельков, М.Е. Аксельрод, Е.М. Чевкина // *Российский биотерапевтический журнал*. – 2019. – Т.18. – №4. – С.43-50.
7. **Еникеев, А.Д.** Неканоническая активность ретиноевой кислоты в отношении активации протеинкиназ в трансформированных клетках различного происхождения / А.Д. Еникеев, А.В. Комельков, И.Б. Зборовская, С.А. Галецкий, Г.О. Скрябин, Е.М. Чевкина // *Успехи молекулярной онкологии*. – 2018. – Т.5. – №4. – С.127-130.