

**федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии
имени Н.Н. Блохина»
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Чевкина Елена Максимовна

Москва - 2024 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1 Ретиноевая кислота: основные функции и механизмы внутриклеточной активности	11
1.2 Неканоническая активность РК	17
1.3 Белки, связывающие РК	20
1.4 CRABP1 и CRABP2, строение и функции	21
1.5 Роль CRABP1 и CRABP2 в канцерогенезе	27
1.5.1 CRABP2 в клетках злокачественных опухолей	27
1.5.2 CRABP1 в клетках злокачественных опухолей	30
1.6 Гипотезы формирования резистентности клеток к РК.....	36
1.6.1 Гипотеза нарушения классического ретиноевого сигналинга.....	37
1.6.2 Участие коактиваторов - белков семейства iLBP, связывающих РК.....	41
1.6.3 Изменение метаболизма РК	42
1.6.4 Гипотеза связи неканонической активности РК с РК-чувствительностью клеток.....	43
1.7 Рак молочной железы и РК-чувствительность (Выбор модели)	44
1.8 Заключение	46
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	47
2.1 Клеточные линии и условия культивации	47
2.2 Выделение плазмидной ДНК	47
2.3 Трансформация компетентных клеток <i>E. coli</i>	48
2.4 Трансфекция	49
2.5 Инфекция псевдовиральными частицами	50
2.6 Приготовление клеточных лизатов	51
2.7 Иммуноблоттинг	51
2.8 Исследование клеточных характеристик <i>in vitro</i> . Анализ динамики роста клеток	52
2.9 Обработка клеток АТРА	53
2.10 Проточная цитофлуориметрия.....	54
2.11 Выделение тотальной РНК.....	55
2.12 Обратная транскрипция и ПЦР в реальном времени.....	56
2.13 Оценка влияния ингибиторов ДНК-метилтрансферазы и HDAC на экспрессию генов	57
2.14 Выделение ДНК из клеток	58
2.15 Бисульфитное секвенирование	58
2.16 Статистическая обработка результатов	60
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	61

3.1 Исследование уровня чувствительности малигнизированных клеток к ретиноевой кислоте и возможной связи экспрессии белков CRABP с РК-резистентностью	61
3.1.1 Сравнение чувствительности к ретиноевой кислоте опухолевых клеток различного происхождения	61
3.1.2 Экспрессия CRABP в РК-чувствительных и РК-резистентных клетках опухолей различного происхождения.....	62
3.1.3 Исследование связи чувствительности к ретиноевой кислоте с экспрессией CRABP1 в клетках рака яичника	64
3.1.4 Сравнение чувствительности к ретиноевой кислоте клеток рака молочной железы.....	67
3.1.5 Исследование механизмов рост-ингибирующей активности ATRA в клетках рака молочной железы с разной чувствительностью к ретиноевой кислоте.....	69
3.1.6 Анализ продукции белков CRABP1 и CRABP2 в клетках рака молочной железы.....	73
3.1.7 Анализ уровня мРНК CRABP1 и CRABP2 в линиях клеток рака молочной железы с различным уровнем чувствительности/резистентности к ретиноевой кислоте.....	77
3.1.8 Анализ влияния деметилирования ДНК и ингибирования деацетилирования гистонов на экспрессию CRABP1.....	78
3.2 Исследование роли белков CRABP1 и CRABP2 в регуляции пролиферации и чувствительности к ретиноевой кислоте клеток рака молочной железы	81
3.3 Анализ экспрессии ядерных рецепторов ретиноевой кислоты, RAR α и RAR β , в клетках рака молочной железы с разным уровнем чувствительности к ретиноевой кислоте	90
3.4 Анализ экспрессии цитохромов CYP26A1 и CYP26B1 в клетках рака молочной железы с разным уровнем чувствительности к ретиноевой кислоте	92
3.5 Исследование неканонической активности ретиноевой кислоты в отношении активации протеинкиназ АКТ и ERK1/2 в трансформированных клетках с разным уровнем чувствительности к ретиноевой кислоте и экспрессии CRABP1	94
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	98
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	114
ВЫВОДЫ.....	115
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	116
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	117

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы и степень её 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, производным витамина А (ретинола), внутриклеточные метаболиты которого (ретиноиды), такие как каротин, ретиналь, полностью транс-ретиноевая кислота (АТРА, All-trans retinoic acid - полностью транс-ретиноевая кислота), 9-цис ретиноевая кислота, 13-цис ретиноевая кислота и др. являются важнейшими регуляторами дифференцировки, роста клеток и апоптоза. РК является важным регулятором многочисленных системных процессов, протекающих в организме. Она участвует в эмбриональном развитии, выступая в роли одного из ключевых морфогенов, а также играет роль в ремоделировании тканей и различных аспектах функционирования иммунной системы. Кроме того, РК выполняет ряд внутриклеточных функций, связанных со стимуляцией дифференцировки, передачей апоптотических сигналов и негативной регуляцией пролиферации. Благодаря своей про-дифференцировочной функции, в аспекте канцерогенеза она выступает в качестве опухоли-супрессорного фактора. Одна из основных форм РК (АТРА), нашла применение в клинической онкологии в качестве противоопухолевого агента для лечения острого промиелоцитарного лейкоза (ОПЛ). Применение системных ретиноидов одобрено Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration (FDA)) для лечения Т-клеточной лимфомы и ОПЛ. В настоящее время предпринимаются попытки использования РК и других ретиноидов в терапии других типов онкопатологий [11, 32, 49, 81, 199]. Несмотря на это, использование РК для лечения злокачественных солидных новообразований по-прежнему имеет существенные ограничения. Это связано, в первую очередь, с развитием резистентности опухолевых клеток, а кроме того, с широким спектром нежелательных побочных реакций [78, 81]. Кроме того, в некоторых типах клеток и тканей (прежде всего кожа и нейронные клетки) РК выполняет противоположную функцию, стимулируя выживание и пролиферацию клеток [50, 97, 112, 186, 191]. Причины таких функциональных различий, так же, как и механизмы формирования РК-резистентности, до настоящего времени не до конца выяснены. Предположительно они могут определяться тем, с каким именно рецептором будет взаимодействовать РК, так как ядерные рецепторы РК могут «предпочтительно» активировать «опухоль-супрессорные» или «опухоль-промоторные» гены [191]. Однако, эта модель является очень упрощенной, и в ряде случаев соотношение экспрессии рецепторов, подавляющих опухолевый рост (RAR/RXR), и рецепторов,

способствующих развитию опухоли (PPAR), не соответствует предполагаемому эффекту РК и не ассоциировано с формированием резистентности к РК. Одним из потенциальных механизмов резистентности может являться образование атипичных гетеродимерных комплексов между рецепторами RAR или RXR с иными типами рецепторов, например, с ER α (рецептор эстрогена), VDR (рецептор витамина Д), а также рецепторами AP-1 и LXR. Среди других причин, определяющих резистентность клеток к РК, предположительно выделяют такие факторы, как эпигеномное молчание рецептора RAR β , потерю ко-активаторов РК, усиление катаболизма РК, снижение ее биодоступности и снижение проведения классических РК-зависимых внутриклеточных сигналов. Это деление представляется достаточно условным, поскольку все перечисленные явления в действительности взаимосвязаны и, по-видимому, взаиморегулируются на нескольких уровнях. В этом отношении 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 рецепторам, причем с разной предпочтительностью, а также, по-видимому, участвуют в регуляции биодоступности и метаболизма РК. Есть основания полагать, что они играют важнейшую роль в приобретении резистентности клеток к РК, хотя до сих пор этот вопрос практически не исследовался. Представителями этой небольшой группы являются высоко гомологичные белки CRABP1 и CRABP2 (Cellular Retinoic Acid binding proteins 1-2), функции которых как в отношении функционирования РК и проведения РК-зависимого сигналинга, так и в отношении опухолевой прогрессии в целом, очень различны и до сих пор недостаточно понятны [4, 209]. Ситуацию дополнительно осложнила не так давно показанная так называемая «неканоническая» или «негеномная» активность РК, связанная с нетранскрипционной активацией ряда белков, считающихся важнейшими регуляторами малигнизации клеток, таких как митоген-активируемые киназы p38 и ERK1/2, а также киназа АКТ, негативно регулирующая апоптоз [10, 138]. Также есть данные о том, что эта активность усиливает злокачественный потенциал клеток и может являться одним из механизмов формирования устойчивости клеток к РК [82, 178]. С другой стороны, имеются данные, указывающие на то, что «негеномная» РК-зависимая активация данных киназ может быть задействована в реализации транскрипционной анти-онкогенной активности РК, как это было показано для p38МАРК [28]. Тем не менее, исследования, посвященные анализу данной активности РК, носят весьма фрагментарный характер, а результаты работ, выполненных лишь на нескольких линиях клеток, противоречат друг другу. Молекулярные механизмы этого феномена до сих пор малопонятны, а роль белков, связывающих РК, в неканонической активности РК практически не исследовалась.

Работа направлена на изучение механизмов, определяющих чувствительность и резистентность злокачественных клеток к действию РК и выявлению роли белков CRABP в отношении реализации активности РК, формировании РК-резистентности и малигнизации клеток рака молочной железы.

Цель исследования

Выяснение факторов, участвующих в формировании резистентности опухолевых клеток к ретиноевой кислоте, и роли белков CRABP1 и CRABP2 в регуляции роста и чувствительности к ретиноевой кислоте 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.

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 крайне 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. Полученные данные имеют и практическую значимость в контексте разработки методов терапии солидных опухолей с использованием 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.

Методология и методы исследования

Влияние РК на характеристики роста опухолевых клеток оценивали с помощью инкубации клеток с АТРА (all-trans retinoic acid, полностью транс-ретиноевая кислота) 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. Для получения гиперэкспрессии кодирующие последовательности генов *CRABP1* и *CRABP2* были трансдуцированы в исследуемые клетки в составе ретровирусного вектора pLXSN. Для подавления экспрессии последовательности малых шпилечных РНК (shRNA) были трансдуцированы в составе лентивирусного вектора pLKO.1puro. Получение 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.

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, выявлена в малигнизированных клетках различного происхождения вне зависимости от чувствительности к РК и экспрессии CRABP1.

Соответствие диссертации паспорту научной 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.)».

Степень достоверности и апробация результатов

Исследование выполнено с использованием современного оборудования, а также с применением современных методов статистического анализа данных. Все эксперименты выполнялись с использованием отрицательных и положительных контролей и не менее, чем в трех независимых повторах. Все это позволяет считать полученные результаты достоверными.

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).

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.

Публикации по теме диссертации*

По материалам диссертации опубликовано 14 публикаций, в том числе - 3 статьи в журналах, которые внесены в перечень рецензируемых изданий, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для опубликования основных результатов исследований.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Ретиноевая кислота: основные функции и механизмы внутриклеточной активности

Ретиноевая кислота (РК) является сигнальной молекулой, относящейся к классу ретиноидов, и внутриклеточным дериватом ретинола (витамина А). Одной из важнейших функций РК в организме является регуляция органогенеза за счет стимуляции дифференцировки клеток [66, 67]. В этой связи РК и ее производные (ретиноиды) находят применение в клинической практике как индукторы клеточной дифференцировки для лечения некоторых опухолей кроветворной системы [182, 228, 243]. Несмотря на однозначный успех в применении АТРА (all-trans retinoic acid), наиболее активного изомера РК, в терапии острого промиелоцитарного лейкоза [41, 180] [189], использование этого соединения в терапии других опухолей ограничено ввиду побочного действия ретиноидов и быстро развивающейся резистентности [33, 55].

В клетке АТРА и ее изомеры (9-цис и 13-цис ретиноевая кислота) образуются из ретинола и его эфиров путем окисления последних до ретинальдегида ферментами ретинолдегидрогеназами (ADH1-4) с последующим окислением до РК ферментами ретинальдегидрогеназами (RALDH) [114, 213]. Избыток РК удаляется с помощью катаболизма цитохромами, преимущественно ферментами семейства P450 – CYP26A1, CYP26B1, CYP26C1 (Рисунок 1). Данные ферменты окисляют изомеры РК до 4-оксо-РК (4-охо-РА) и 4-гидрокси-РК (4-ОН-РА) и других полярных метаболитов (Рисунок 2), которые считаются менее активными и легче выводятся из клетки [5]. Стоит отметить, что гены, кодирующие белки цитохрома, являются ретиноид-респонсивными, что свидетельствует о негативной обратной регуляции, которая необходима для поддержания определенного уровня внутриклеточной концентрации РК [207].

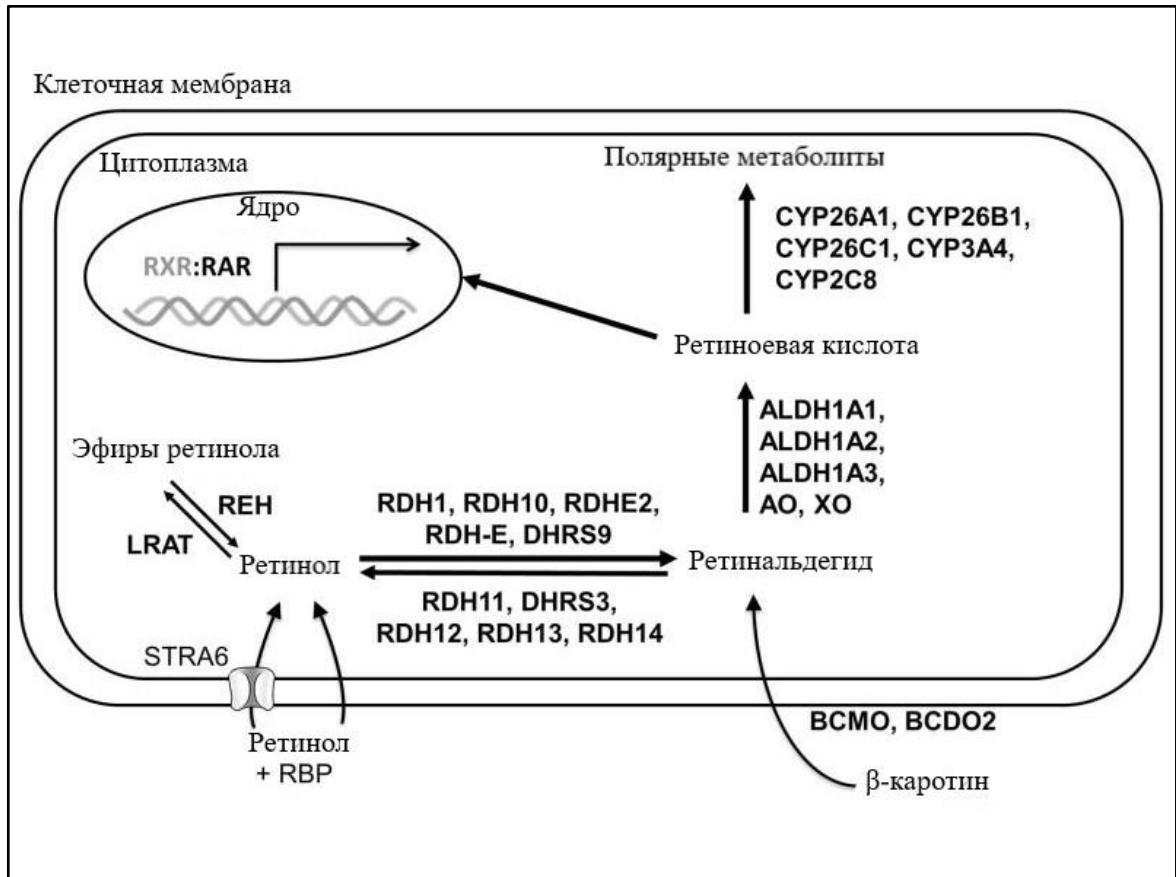


Рисунок 1 - Метаболизм РК. Пояснения в тексте. Адаптировано из [200]

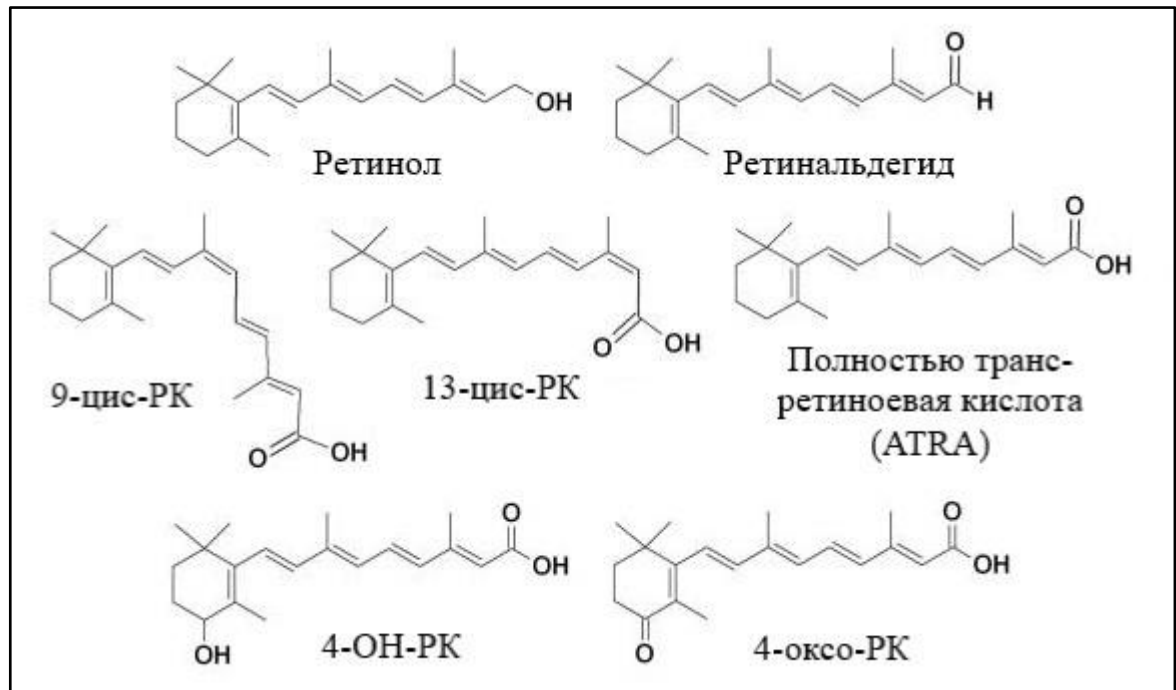


Рисунок 2 - Основные изоформы РК, предшественники и метаболиты. Адаптировано из [200]

Как было сказано выше, РК участвует в дифференцировке клеток различных тканей и процессах морфогенеза [45, 58, 60, 87, 128, 139]. В частности, многочисленные исследования показывают, что РК и другие ретиноиды играют ключевую роль в процессах гемопоэза [48, 162], развитии таких органов, как: головной и спинной мозг [133], сердце, глаза [216], скелет, передние конечности [95], легкое [99], первичные и вторичные лимфоидные органы [51, 108].

Также имеется ряд исследований, которые свидетельствуют о важной роли РК, ретинола и других ретиноидов в процессах иммунного ответа [107, 145]. Так, РК совместно с провоспалительными цитокинами способствует активации дендритных клеток и дифференцировке эффекторных Т-клеток [158]. РК повышает экспрессию интегринов $\alpha\beta 7$ и рецептора хемокинов CCR9 в лимфоцитах, что усиливает их хоминг (миграцию в очаг воспаления) [143]. Помимо этого, воздействие РК на В-клетки способствует их активации, дифференцировке в плазматические клетки и приобретению способности секретировать антитела [72].

Все вышеперечисленные данные о том, что РК модулирует иммунный ответ, играют ключевую роль в дифференцировке клеток различных органов и в других физиологических процессах позволяют рассматривать РК в контексте канцерогенеза в качестве противоопухолевого агента. Так, наиболее активный изомер ретиноевой кислоты АТРА применяется в терапии ряда злокачественных новообразований (ЗНО): острого промиелоцитарного лейкоза, саркомы Капоши [34], опухолей головы и шеи [113], карциномы яичника, рака мочевого пузыря и нейробластомы [254], а также некоторых других [32, 49, 81]. Интересно, что в некоторых типах ЗНО РК ингибирует фактор роста эндотелия сосудов VEGF, ключевого регулятора ангиогенеза [115, 135].

Некоторые экспериментальные данные свидетельствуют о том, что РК и другие ретиноиды подавляют развитие ряда карцином, в том числе рака легкого [129], рака молочной железы [195] и рака желудка [22, 153].

Для ряда ЗНО имеются данные *in vitro*, подтверждающие эффекты РК как про-дифференцировочного агента. В частности, в линиях HL-60 (промиелоцитарный лейкоз), F9 (тератокарцинома) и некоторых линиях меланомы РК индуцировала дифференцировку клеток, и снижение пролиферации [26, 65].

Экспериментальные исследования активности РК показали ее способность подавлять синтез ДНК, увеличивать время удвоения клеток и ингибировать рост колоний клеток в мягком агаре. Важно, что РК, будучи природным соединением, в отличие от многих других терапевтических агентов, не обладает цитотоксическим действием в отношении опухолевых клеток, а проявляет антипролиферативное действие, индуцируя клеточный арест в G1 стадии клеточного цикла [236]. Также ретиноиды эффективно подавляют прогрессию таких неопластических заболеваний как рак гортани [100], опухоли головы и шеи [101] и рак шейки

матки [84]. Во второй и третьей фазах клинических исследований РК снижала развитие дисплазии шейки матки на 50% [140, 201].

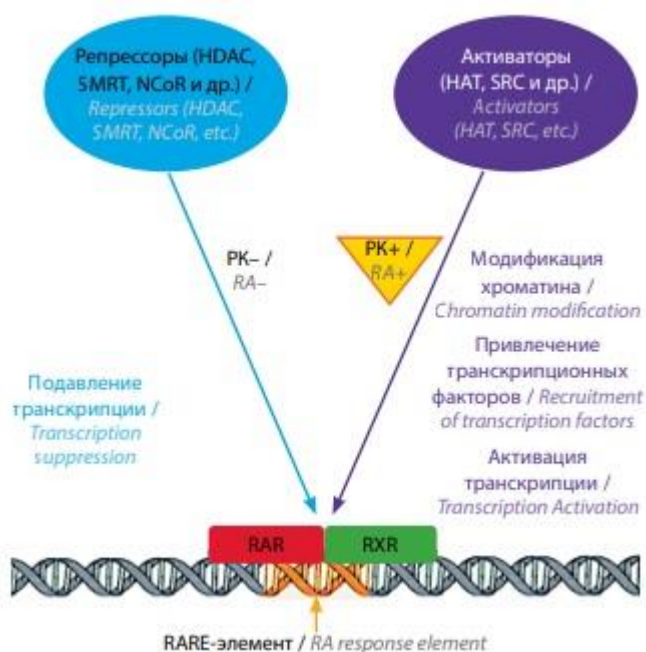
Несмотря на сильный противоопухолевый эффект РК, наблюдаемый во многих типах опухолей, в случае отдельных ЗНО терапия ретиноидами приводит к обратному эффекту, способствуя выживанию и пролиферации опухолевых клеток. Прежде всего, такие эффекты наблюдаются в опухолях и активно пролиферирующих клетках кожи [50] и, возможно, реализуется с помощью механизмов, аналогичных тем, которые лежат в основе процессов заживления ран [112, 253]. Сходное действие оказывает РК и в нейронах [97, 108, 174, 186]. РК также способна стимулировать пролиферацию, ангиогенез и миграционную активность мезенхимальных стволовых клеток [175], клеток рака легкого [82, 178] и глиомы [190].

Одной из возможных причин, объясняющих такие противоречивые данные о влиянии РК на пролиферацию клеток, может быть различие в тканеспецифичной активации ядерных рецепторов в разных клетках [191].

Основным механизмом, опосредующим активность РК, является ее связывание в ядре с рецепторами, транскрипционными факторами, активирующими транскрипцию свыше 500 генов, промоторные области которых содержат последовательности, называемые ретиноид-респонсивными элементами (Retinoic Acid Responsive Elements, RARE). Многочисленные данные свидетельствуют о том, что РК регулирует активность генов клеточной дифференцировки. Например, показано, что РК способна активировать экспрессию множества генов, играющих ключевую роль в процессах развития организма, таких как Нох-гены, рецептор ретиноевой кислоты бета (RAR β), а также гены, кодирующие ламинин B1, коллаген IV типа и ряд других [24, 53]. Ядерные рецепторы РК относятся к суперсемейству рецепторов, включающих стероидные, тиреоидные, PPAR α , витамин D-рецепторы, которые реализуют свою активность как лиганд-зависимые транскрипционные факторы. В их составе имеются 3 домена: С-терминальный лиганд-связывающий домен (LBD), ДНК-связывающий центральный домен (DBD) и аминокислотный трансактивационный домен (AF-1) [90]. Основными рецепторами, связывающими ретиноевую кислоту, являются RAR (рецептор ретиноевой кислоты) и RXR (ретиноидный X-рецептор), а также несколько гомологичных белков PPAR – рецепторов, активируемых пероксисомными пролифераторами [191, 194]. Все перечисленные белки характеризуются наличием подтипов α , β и γ , каждый из которых кодируется собственным геном. Также у каждого из подтипов имеется несколько изоформ, которые либо транскрибируются с разных промоторов, либо являются продуктами альтернативного сплайсинга. Так, для RAR α известно 2 изоформы, RAR α 1 и RAR α 2, так же, как и для RAR γ – RAR γ 1, RAR γ 2, в то время как RAR β имеет пять изоформ – β 1-4 и β 1'. Изоформы RAR транскрибируются с разных промоторов: α , β 1 и 3, γ 1 - с P1 (класс I), а α 2, β 2 и 4, γ 2 – с

промотора P2 (класс II). Каждый подтип белков RXR имеет по 2 изоформы – RXR α 1, RXR α 2, RXR β 1, RXR β 2, RXR γ 1, RXR γ 2 [32]. Новые данные свидетельствуют о наличии еще одной изоформы RAR β – RAR β 5, которая транскрибируется с промотора P3(класс III), который, в отличие от других изоформ, не имеет последовательности RARE [44]. С большинством изоформ рецепторов RAR связывается именно транс-ПК, в то время как другие изомеры ПК либо не способны связываться с данными рецепторами, либо делают это со значительно меньшей аффинностью. Так, 9-цис ПК способна слабо связываться только с RAR α , а все цис-изомеры ПК способны взаимодействовать с рецепторами RXR [98], в особенности изомер 13-цис ПК [106]. Исследования взаимодействия ПК с рецепторами PPAR различных изоформ показали, что транс-ПК взаимодействует только с PPAR δ/β (PPARD), но не с PPAR α (PPARA), PPAR γ (PPARG) [194]. Что касается рецепторов RXR, на примере эмбриогенеза авторами показано, что в контексте ПК-сигнализации ключевую роль играет именно RXR α .

Для активации экспрессии генов-мишеней ядерные рецепторы RXR формируют гомодимеры, а белки RAR и PPARD активируют транскрипцию - гетеродимерные комплексы с RXR. Белки RAR связываются с ДНК в специфических последовательностях (RARE), представляющих собой несколько повторов консенсусных гексамерных последовательностей (A/G)G(G/T)TCA или (A/G)G(G/T)(G/T)(G/C)A, разделенных одним, двумя или пятью нуклеотидами [86, 211]. Предполагается, что в отсутствие ПК транскрипционная активность комплекса RAR-RXR ограничивается взаимодействием с SMRT, NCoR или другими корепрессорами. Присоединение лиганда (ПК) вызывает конформационные перестройки в лиганд-связывающем домене белка RAR, что приводит к высвобождению репрессоров и рекрутированию факторов, активирующих транскрипцию, включая гистоновые ацетилтрансферазы (НАТ) или гистоновые аргининметилтрансферазы, белки SRC-1, -2, -3 и др. Эти взаимодействия стимулируют модификации гистонов, способствуют рекрутированию РНК-полимеразы II (Рисунок 3) и в результате индуцируют транскрипцию генов-мишеней [14, 134, 156, 167, 177]. Помимо RAR и PPARD, белки RXR способны формировать гетеродимеры с другими группами ядерных рецепторов, включая FXR (рецептор желчных кислот), TR (рецептор тиреоидного гормона), упомянутый выше VDR (рецептор витамина D), а также рецепторы определенного типа ксенобиотиков и некоторые другие. Среди генов, экспрессия которых контролируется ПК, можно выделить истинно ПК-респонсивные, напрямую регулируемые ПК за счет наличия в промоторных областях RARE-элементов. Их экспрессия этих облигатно стимулируется при инкубации клеток с ПК. К другой группе относят гены, опосредованно регулируемые ПК. Такие гены не содержат RARE и их экспрессия может меняться в разную сторону при обработке клеток ПК, поскольку данные гены регулируются продуктами экспрессии генов первой группы.



При отсутствии лиганда гетеродимерный комплекс, состоящий из рецепторов RAR и RXR, образует связь с белками-корепрессорами транскрипции, такими как NCoR, SMRT и другими. Связывание РК с гетеродимером RAR-RXR влечет за собой диссоциацию корепрессоров и последующее рекрутирование активаторов транскрипции, включая белки SRC-1, -2, -3 и HAT. Это, в свою очередь, приводит к модификации гистонов и рекрутированию РНК-полимеразы II. Указанные модификации и взаимодействия в итоге приводят к инициации транскрипции генов-мишеней. Адаптировано из [69]

Рисунок 3 - Механизм транскрипционной активности РК

В списке регулируемых РК молекул присутствует и большое количество генов, задействованных в регуляции транспорта и метаболизма ретиноидов, включая саму РК. К ним, в частности, относятся гены, кодирующие белки, связывающие РК (CRABP1 и CRABP2), белки, связывающие ретинол (CRBP1 и CRBP2), ферменты метаболизма РК (RALDH1, CYP26A1, CYP26B1, CYP26C1), а также ядерные рецепторы RAR (α , β и γ изоформы) и др. Также известно, что РК может влиять на активность генов, кодирующих белки внеклеточного матрикса (тканевой активатор плазминогена, ламинин В1, β 3-интегрин, ICAM-1, эритропоэтин, рецептор интерлейкина 2- α), большое количество Нох-генов, играющих важнейшую роль в процессах дифференцировки, а также ферментов метаболизма различных молекул (EDH17B2, NTCP) [185, 212]. Важно отметить, что РК стимулирует транскрипцию целого ряда генов, продукты которых являются ключевыми активаторами опухолевой прогрессии, таких как NF- κ B,

INF γ , TGF β , VEGF и другие [49], а также белки супрессоры, включая p53 [146, 245] и AP-2 [132]. Среди мишеней, регулируемых с помощью PK-RAR пути, можно отметить каспазы, в том числе каспазу 7 (PK-респонсивный ген, прямая регуляция), каспазу 9 (опосредованная регуляция), а также некоторые сериновые протеазы, активирующие данные каспазы [61]. К прямым мишеням PK относится и ген Btg2, В-клеточной транслокации, зависимый от p53 [62]. Интересно, что PK способствует снижению экспрессии ряда про-апоптотических генов и генов, вовлеченных в негативную регуляцию пролиферации и апоптоза, таких как сурвивин (ген Birc5) и Bcl-2 [176, 181]. К числу других PK-RAR регулируемых молекул принадлежат TRAIL (Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand), C/EBPepsilon (CCAAT/enhancer binding protein), UBE1L (ubiquitin-activating enzyme E1-like protein) [12, 116, 159], а также транскрипционный фактор SOX9 и белок PDCD4 (Programmed cell death protein 4), опухолевый супрессор, связывающий факторы инициации трансляции [6, 7].

Важно отметить, что разные рецепторы PK регулируют транскрипцию разных ретиноид-респонсивных генов. Предполагается, что эффект PK зависит от того, какой именно тип рецепторов активируется, и в каком соотношении рецепторы PK экспрессируются в опухоли или клеточной линии. Рецепторы RAR в основном стимулируют транскрипцию генов, ответственных за остановку или задержку прохождения клеточного цикла, запуск процессов дифференцировки и активации апоптоза [61], а белки PPAR α , напротив, по всей видимости, ответственны за увеличение пролиферативной активности клеток, повышение их выживаемости и активации процессов ангиогенеза. Согласно данной концепции, в трансформированных клетках с высокой экспрессией рецепторов RAR PK подавляет рост опухолей, в то время как в клетках, продуцирующих PPAR α , PK усиливает их злокачественный фенотип [122, 154, 191]. Поскольку в большинстве тканей соотношение уровней данных рецепторов сдвинуто в сторону RAR, PK чаще всего реализует опухоль-супрессорную функцию (негативная регуляция пролиферации, стимуляция апоптоза или дифференцировки). Возможно также, что образование «атипичных» гетеродимеров между рецепторами RAR и приведенными выше рецепторами (VDR, TR, LXRs и др.) также может влиять на эффект транскрипционной активности PK [32].

1.2 Неканоническая активность PK

Недавние исследования показали, что у PK наряду с канонической, то есть транскрипционной активностью, существует и так называемая "неканоническая" или "негеномная" активность. Эта активность PK реализуется в цитоплазме, не требует участия RAR (во всяком случае в качестве факторов транскрипции) и заключается в активации

ключевых сигнальных белков, регулирующих опухолевую прогрессию. В частности, обнаружено краткосрочное, реализуемое за 5-30 минут инкубации с РК, усиление активирующего фосфорилирования протеинкиназ АКТ и ERK1/2. Данный феномен показан одной группой ученых в двух исследованиях на клеточных линиях рака легкого [82], а другой группой авторов - в двух исследованиях на модели нейробластомы [130, 138].

Сходный феномен обнаружен в отношении киназы p38MAPK в исследованиях двух авторских коллективов, выполненных на клеточных линиях рака молочной железы MCF7, рака шейки матки HeLa, эмбриональных фибробластах мыши MEF и F9 тератокарциномы мыши. Так, было продемонстрировано, что РК стимулирует фосфорилирование p38MAPK, которое усиливает активность белков-коактиваторов RAR, задействованных в деконденсации и ремоделировании хроматина [88]. Интересно, что по данным той же группы авторов, такая активация p38MAPK, в свою очередь, необходима для осуществления транскрипционной активности РК с участием белков RAR. По результатам исследования, p38MAPK, активированная РК на пост-транскрипционном уровне, фосфорилирует киназу MSK1, фосфорилирующую S369 в лиганд-связывающем домене RAR α . Это приводит к формированию белкового комплекса с транскрипционным фактором TFIIH (Transcription Factor II H) и обеспечивает последующее активирующее фосфорилирование RAR α с участием также входящей в комплекс циклин-зависимой киназы cdk7/cyclin H по остатку S77, находящемуся в N-терминальном домене. Киназа MSK1 помимо RAR α фосфорилирует гистон H3 по остатку серина S10. Описанный сложный каскад последовательных фосфорилирований, инициированный взаимодействием p38MAPK-MSK1, приводит к перемещению суперкомплекса RAR α /TFIIH к РК-респонсивным элементам промоторов генов-мишеней. Такой путь регуляции транскрипции был показан, в частности, для цитохрома CYP26A1. Принципиально отметить то, что в малигнизированных клетках, в которых блокирован p38MAPK/MSK1 каскад, РК не оказывает данного эффекта. Так, в клетках линии SKBR3, в отличие от MCF7, отсутствовал эффект РК-зависимого фосфорилирования p38MAPK и не наблюдалось повышения экспрессии CYP26A1 [28].

Интересно, что подобный механизм может задействовать и нетранскрипционную активность рецепторов RAR. Так, той же группой авторов в другом исследовании было показано, что РК-зависимая активация RAR осуществляется в определенных микродоменах плазматической мембраны, называемых липидными рафтами, где РК стимулирует формирование комплекса молекул RAR α с заякоренным в рафтовых структурах белком G α (G protein alpha). Авторы считают, что такая активность RAR α представляет собой один из ключевых этапов РК-зависимой активации p38MAPK [173].

Однако, по результатам исследований другой группы ученых с использованием той же линии MCF7, а также клеток острого промиелоцитарного лейкоза, РК-зависимое фосфорилирование киназы p38MAPK подавляет дифференцировку, то есть приводит к противоположному эффекту РК, а подавление РК-зависимой активации данной киназы способствовало дифференцировке и снижению пролиферации данных клеток [10]. Такой эффект РК по мнению авторов осуществляется с помощью RAR-зависимой активации Rac (малой ГТФазы суперсемейства Ras) и киназного каскада MAPKAPK-2.

Вместе с тем при исследовании РК-зависимого фосфорилирования АКТ на модели немелкоклеточного рака легкого авторы цитированной выше работы предложили иной механизм нетранскрипционной активности РК в отношении данной протеинкиназы. По результатам исследования авторы показали, что рецептор RAR α в отсутствие РК не связан с плазматической мембраной, но рекрутируется туда при добавлении РК к клеткам, где взаимодействует с АКТ, что приводит к активации малой ГТФазы Rac [82]. Интересно, что в данной работе, как и в рассматриваемой выше статье, посвященной РК-зависимой активации p38MAPK, стимуляция активности АКТ вызывает противоположное воздействие на клетки, подавляя каноническую активность РК и способствуя росту, инвазии и выживанию клеток. Подобный эффект, согласно данным тех же авторов, оказывает на клетки и РК-зависимое фосфорилирование ERK1/2, реализуемое с участием нетранскрипционной активности RAR α [178].

Влияние нетранскрипционной активности РК, анализируемое на одних и тех же клетках нейробластомы, в одном из двух исследований также приводило к снижению дифференцировки клеток и увеличению их выживаемости за счет стимуляции PI3K/АКТ каскада [130], в другом – усиливало дифференцировку посредством активации MAP киназы ERK1/2 и сигнального пути PI3K/АКТ [138].

Одним из потенциальных механизмов нетранскрипционной активности РК может быть подавление серин-треониновой киназы PKC α , также хорошо известной сигнальной молекулы, задействованной в опухолевой прогрессии за счет регуляции ключевых клеточных процессов, таких как пролиферация, запрограммированная гибель и дифференцировка. Согласно некоторым данным, PKC α является прямой мишенью РК [157], которая осуществляет негативную регуляцию данной киназы, по-видимому, с помощью конкурентного механизма. Предполагается, что конкуренция за связь с важнейшим активатором PKC α , фосфатидилсерином, может являться одним из механизмов, опосредующих опухоль-супрессорную функцию РК и других ретиноидов за счет подавления роста и стимуляции процессов дифференцировки [179].

Приведенные данные свидетельствуют о том, что внутриклеточная активность РК может осуществляться с помощью двух сценариев. Основным механизмом является стимуляция

транскрипционной активности ядерных рецепторов. Этот эффект реализуется по принципам, аналогичным взаимодействию стероидных гормонов с ядерными рецепторами, является долговременным и проявляется спустя несколько часов. Вторым типом активности РК является ее краткосрочное взаимодействие с белками, приводящее к изменению сигнальных путей, и не затрагивающее транскрипционной регуляции генов. Важно отметить, что несмотря на подтверждение феномена негеномной активности РК в целом, результаты анализируемых исследований (а это все имеющиеся на сегодняшний день работы) очень неоднозначны. Эти противоречия относятся как к результату воздействия неканонической активности РК на клеточные характеристики (дифференцировка и апоптоз или, напротив, усиление роста и выживания), так и к путям реализации данной активности, среди которых RAR-зависимые и RAR-независимые механизмы.

1.3 Белки, связывающие РК

Внутриклеточный метаболизм РК и ее транспорт к ядерным рецепторам осуществляют белки, относящиеся к семейству липид-связывающих белков iLBP. Это небольшие по молекулярной массе белки (~15-16 кДа), характеризующиеся высоко консервативной третичной структурой, способные связывать различный спектр лигандов [92, 117, 221]. К данному семейству относится большое количество белков, в том числе FABP, CRBP, CRABP, каждый из которых способен связывать только определенные молекулы (ретинол, жирные кислоты, желчные кислоты) [46]. В контексте изучения активности РК интерес вызывают белки, связывающие ретиноевую кислоту – CRABP1 и CRABP2. Помимо них, РК могут также связывать FABP5 и в существенно меньшей степени - FABP4.

Представители семейства белков iLBP являются шаперонами, по принципу действия относящимися к так называемым «ядерно-цитоплазматическим шаттлам». Связывание с лигандом приводит к изменениям конформации, которые обеспечивают перемещение данных белков из цитоплазмы в ядро. Это может происходить как за счет «открытия» сигнала ядерной локализации (nuclear localization signal), так и с помощью формирования специфической третичной структуры, которая распознается как NLS. Последнее характерно прежде всего для белков CRABP [193]. Эти модификации приводят к взаимодействию с α -импортинами, что способствует транспорту комплекса белок-РК в ядро, где происходит взаимодействие с ядерными рецепторами. Таким образом данные белки не только предохраняют гидрофобные молекулы РК от деградации в цитоплазме, но и способствуют реализации ее внутриклеточной активности путем ее транспорта к ядерным рецепторам, которые приводят к активации транскрипции различных генов [30, 63, 91]. Показано, что белки CRABP2, FABP5 и FABP4

избирательно взаимодействуют с рецепторами RAR α , PPAR β/δ и PPAR γ соответственно, что приводит к селективной активации регулируемых ими генов. FABP5 способен связывать разные лиганды, но только взаимодействие с РК приводит к его транслокации в ядро, где он связывается с PPAR β/δ [204]. Таким образом, РК, взаимодействуя с PPAR β/δ , способствует, в частности, регуляции экспрессии генов метаболизма сахаров и липидов путем стимуляции липолиза и снижения уровня триглицеридов [236]. Активация FABP4 – PPAR γ , по всей видимости, происходит в клетках достаточно редко, а связывание белкового комплекса CRABP2/RAR с РК характеризуется более высокой аффинностью по сравнению с FABP5/PPAR β/δ [63, 202, 204]. В связи с этим, в большинстве клеток доминирует передача сигнала от РК с помощью комплекса CRABP2-RAR. Можно предположить, что проведение РК-зависимого сигнала посредством FABP5 - PPAR β/δ происходит только в том случае, если содержание FABP5 в клетках превышает уровень CRABP2 [191]. Согласно этой гипотезе, в клетках, характеризующихся высоким соотношением уровней FABP5/CRABP2, преобладает активация рецептора PPAR β/δ , при этом возможность экспрессии отдельных генов-мишеней RAR сохраняется, что было показано для цитохрома *CYP26A1*, продукт которого является основным ферментом катаболизма РК. Предположительно, это может являться регуляторным механизмом, защищающим клетку от избыточной РК-зависимой стимуляции PPAR β [229]. Тем не менее, такая схема представляется достаточно упрощенной. Например, в нее не укладываются достаточно недавно опубликованные данные об РК-зависимой активации генов, регулирующих клеточный цикл и стимулирующих пролиферацию, например, циклина D1 и циклин-зависимых киназ, транскрипция которых регулируется белками RAR/RXR [125]. В соответствии с описанной выше теорией, согласно которой взаимодействие РК с PPAR β/δ стимулирует транскрипцию генов, способствующих росту и выживанию, а взаимодействие с рецепторами RAR - экспрессию генов, ответственных за дифференцировку, арест клеточного цикла и апоптоз, в контексте канцерогенеза CRABP2 принято рассматривать в качестве опухолевого супрессора, хотя это подтверждается не всегда. Что же касается второго гомолога, CRABP1, вопросы о его роли в транслокации РК к ядерным рецепторам и проведении ретиноевой сигнализации в целом, а также о его функциональном значении в канцерогенезе, остаются открытыми.

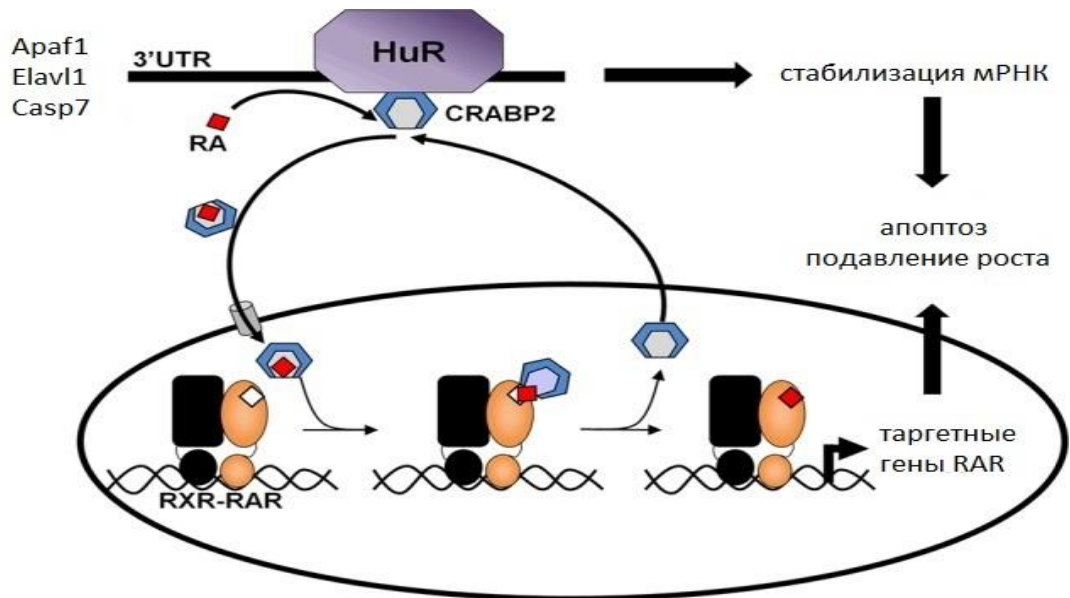
1.4 CRABP1 и CRABP2, строение и функции

Белки CRABP1 и CRABP2 демонстрируют высокую степень гомологии (74% по аминокислотным остаткам) и эволюционную консервативность. Кроме того, CRABP1 и CRABP2 характеризуются значительным сходством третичной структуры. Важно, что белок

CRABP1 отличается максимальной аффинностью к РК среди всех РК-связывающих белков, причем его сродство к РК в два раза выше, чем у CRABP2 [63]. CRABP2 является ядерно-цитоплазматическим «шаттлом», при взаимодействии с РК в цитоплазме происходят конформационные изменения в структуре CRABP2, что позволяет ему связываться с α -импортином, и, таким образом, проникать в ядро [193, 247]. CRABP1 является преимущественно цитоплазматическим белком, однако по некоторым данным, в том числе по результатам наших исследований, может присутствовать в ядре и перинуклеарном пространстве [1, 82, 121]. В тоже время, по результатам других исследований CRABP1, в отличие от второго гомолога, в ядре не обнаруживается [30]. Согласно некоторым данным CRABP1 может также обнаруживаться в митохондриях [188].

В различных типах тканей и на разных этапах онтогенеза наблюдается существенная вариабельность экспрессии белков CRABP1 и CRABP2. Примечательно, что CRABP1 экспрессируется в тканях, максимально чувствительных к РК, то есть тех, в которых избыток РК приводит к нарушениям морфогенеза и порокам развития при эмбриогенезе [218].

Наиболее известная функциональная активность CRABP2 заключается в защите РК от гидрофильной среды цитоплазмы, доставка ее в ядро и передача рецепторам с образованием комплекса РК/CRABP2/RAR, что приводит к стимуляции транскрипционной активности белков RAR [110], что приводит к усилению экспрессии RAR-зависимых генов. и усилению экспрессии RAR-зависимых генов. Помимо основной функции связывания РК, для CRABP2 обнаружены и другие мишени – РНК-связывающие белки представители семейства ELAV (embryonic lethal abnormal vision), в частности, HuD, HuB [91] и HuR [223]. Hu-белки участвуют в пост-транскрипционной регуляции мРНК, а также некодирующих РНК (включая микроРНК) и стабилизации транскриптов (Рисунок 4) [227].

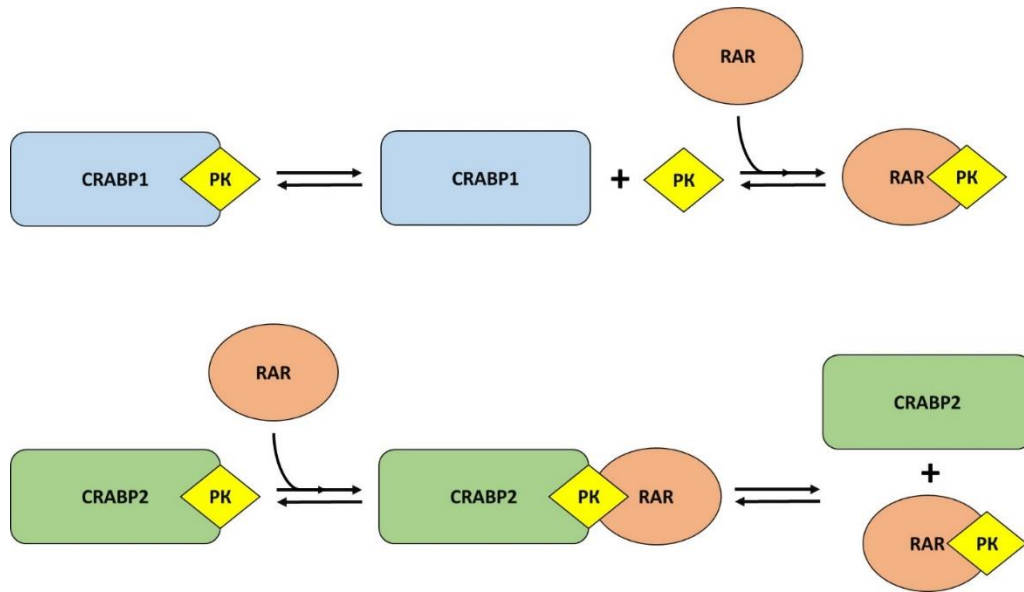


Взаимодействие CRABP2 с белком HuR в цитоплазме приводит к стабилизации транскриптов ряда генов, включая гены, кодирующие про-апоптотические белки (Apaf1, Elavl1, Casp7). С другой стороны, таргетирование РК белком CRABP2 в ядро приводит к активации RAR-зависимых генов, среди которых многие также задействованы в реализации апоптоза. Таким образом, CRABP2 может способствовать подавлению роста опухолей с помощью двух механизмов. Адаптировано из [224]

Рисунок 4 - Схема реализации внутриклеточной активности CRABP2

С помощью непосредственного взаимодействия с этими белками CRABP2 влияет на уровень продукции целого ряда белков, которые могут выполнять как про-апаптотическую и опухоль-супрессорную [223], так, по-видимому, и опухоль-промоторную [91] функции в разных типах клеток.

В отличие от CRABP2, CRABP1 не образует комплекса с RAR, и согласно предложенной модели на рисунке 5, ассоциации РК с RAR предшествует диссоциация комплекса CRABP1-РК [63].



Находясь в цитоплазме, белок CRABP2 связывает PK и доставляет ее в ядро, где осуществляется формирование активного комплекса PK с рецепторами RAR и стимуляции транскрипции PK-зависимых генов. CRABP1 так же связывает PK в цитоплазме, однако если и способен транспортировать PK в ядро, то диссоциирует там, не взаимодействуя с белками RAR

Рисунок 5 - Схема взаимодействия белков CRABP с PK

Эти функциональные различия подтверждаются и обнаруженными структурными различиями. В частности, было продемонстрировано важное функциональное значение аминокислотных остатков GLN75, PRO81 и LYS102, располагающихся перед так называемым лиганд-связывающим «карманом» CRABP2, в осуществлении трансфера PK от CRABP2 к рецептору и увеличении транскрипционной активности RAR [29]. Роль CRABP1 в ядре на сегодняшний день недостаточно ясна. Надо сказать, что функции CRABP1 до сих пор вообще очень мало понятны, несмотря на то, что как уже говорилось, этот белок обладает наибольшей аффинностью к PK среди всех PK-связывающих белков. Так, прямых подтверждений возможного сходства действия между CRABP1 и CRABP2 в литературе практически нет, несмотря на их гомологию и сходную локализацию (цитоплазма/ядро). Есть данные о CRABP1-зависимом усилении физиологического действия PK на пролиферацию супрабазальных кератиноцитов мыши [206]. Однако кератиноциты, как описано выше, характеризуются нетипичным действием PK, приводящим к стимуляции пролиферативной активности. По данным, полученным ранее в лаборатории регуляции клеточных и вирусных онкогенов НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, у белка CRABP1 также имеются функции, не зависящие от PK. Так, показано, что мутантный CRABP1, не способный связывать PK, наряду с белком дикого

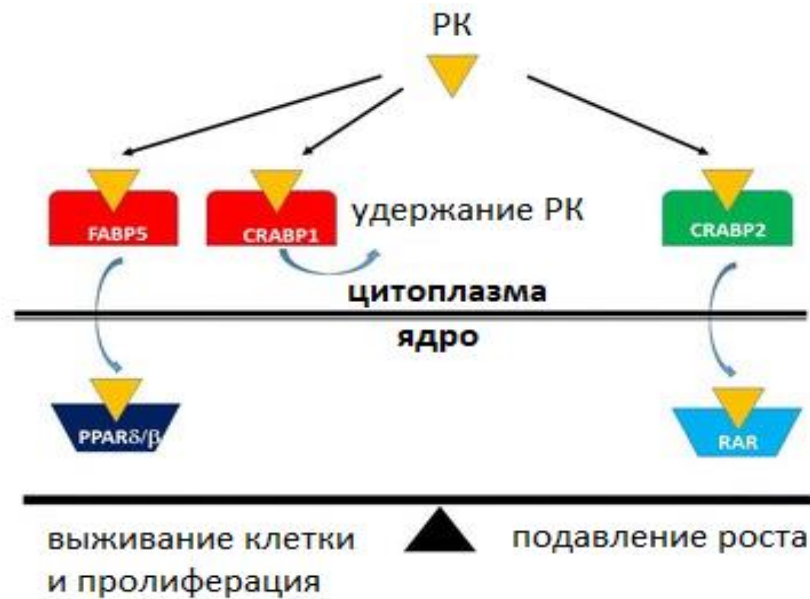
типа вызывает опухоль-ассоциированные изменения в клетках млекопитающих [111]. Это согласуется с представленными выше данными о наличии дополнительных мишеней у белка CRABP2. По аналогии с CRABP2, CRABP1, не будучи связанным с РК, вероятно, тоже может взаимодействовать с подобными белками (например, Nu-белками), что может влиять на активность различных генов и клеточные характеристики в целом.

К наиболее вероятным из предполагаемых функций CRABP1 можно отнести предохранение клетки от избыточной активности РК. Такая негативная регуляция может реализовываться как с помощью конкурентного механизма за счет секвестрирования (удержания) РК в цитоплазме и препятствования ее взаимодействию с другими РК-связывающими белками, так и за счет усиления катаболизма РК. В поддержку этой гипотезы свидетельствует некоторый пул данных о снижении эффекта РК в присутствии этого белка. Например, было показано влияние гиперэкспрессии CRABP1 на подавление транскрипции некоторых ретиноид-респонсивных генов, включая рецептор $RAR\beta$, коллаген 4-го типа и ламинин B1 [23]. Этой же группой авторов на клетках F9 тератокарциномы было показано увеличение скорости катаболизма РК в присутствии CRABP1 [24]. Более того, есть данные о том, что связывание с CRABP1 способствует ее взаимодействию с цитохромом CYP26A1 [77, 150, 151]. Помимо этого, на модели плоскоклеточного рака головы и шеи (линия клеток AMC-HN-7) обнаружено, что гиперэкспрессия CRABP1 снижает РК-чувствительность клеток и даже приводит к увеличению содержания полярных метаболитов, являющихся продуктами ее окисления. В этой же работе показано и подавление транскрипционной активности рецепторов РК при гиперэкспрессии CRABP1 [231]. Вместе с тем, имеются данные, свидетельствующие о противоположной роли CRABP1. Так, в одной из работ обработка высокими дозами РК клеток РМЖ с подавленной экспрессией CRABP1 приводило к возрастанию уровня CYP26A1 [125]. В другой работе гомозиготная делеция гена CRABP1 в эмбриональных стволовых клетках приводила к снижению внутриклеточной концентрации РК [37]. Интересно, что в этих клетках также была снижена внутриклеточная концентрация полярных метаболитов РК, в то время как в среде она была повышена. Авторы также показали, что делеция CRABP1 сопровождалась усилением экспрессии CRABP2, который транспортирует РК в ядро, что может влиять на результат оценки свободной РК.

Также возможно, что увеличение концентрации РК при делеции CRABP1 «вынуждает» клетку снижать продукцию РК и усиливать ее катаболизм. Такая гипотеза впервые была высказана в работе 2015 года, выполненной на клетках рака молочной железы, где было показано, что CRABP1 наряду с CRABP2 модулирует экспрессию ретиноид-респонсивных генов, включая целый ряд генов, задействованных в биосинтезе РК и ее метаболизме, а также множество других РК-регулируемых генов. Авторы предполагают, что обнаруженные ими

изменения экспрессии РК-зависимых генов в ответ на подавление CRABP1 являются результатом не усиления транскрипционной активности РК, а увеличения количества свободной РК в цитоплазме вследствие снижения количества CRABP1 в клетке. При этом нокдаун CRABP1 в присутствии РК приводил к РК-зависимому увеличению экспрессии CYP26A1 и снижению экспрессии фермента ALDH1B1 (катализатора биосинтеза РК) [125]. Цитируемая работа представляется крайне значимой в контексте исследования функциональной роли белков CRABP, поскольку это практически единственное исследование, в котором изучалась функциональная активность обоих белков CRABP одновременно в одних клетках. Сравнение продукции и локализации белков CRABP1 и CRABP2 в тканях рака молочной железы выявило обратную корреляцию между экспрессией двух гомологов. Полученные на клеточных линиях РМЖ данные свидетельствуют о противоположной роли данных белков в проведении ретиновой сигнализации. Более того, было показано, что CRABP1 с помощью конкурентного механизма негативно регулирует активность CRABP2 и блокирует его ядерную транслокацию. На основании данных работы и ранее полученных результатов авторами предложена модель, согласно которой CRABP1 является регулятором внутриклеточного баланса активности РК, конкурируя с белком CRABP2 и «содействуя» тем самым проведению сигнала FABP5/PPAR β/δ . Эти данные согласуются с приведенными выше данными о повышении экспрессии CRABP2 в клетках с делетированным CRABP1 [37], а также с данными цитируемой выше работы о повышении экспрессии CRABP1 в клетках наиболее чувствительных к избытку РК [218]. Данные, полученные в лаборатории регуляции клеточных и вирусных онкогенов НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, свидетельствуют о том, что в образцах НМПЛ экспрессия этих двух генов коррелирует между собой (как на уровне мРНК, так и белковой продукции) [73]. Очень важно, что эта корреляция присутствует лишь на ранних стадиях заболевания и исчезает на поздних. Эти результаты указывают на наличие взаиморегуляции двух гомологов CRABP, которая утрачивается в ходе прогрессии. Согласно нашей гипотезе CRABP1 действительно конкурирует с CRABP2 за связь с РК, однако это не обязательно должно приводить к усилению сигнала по пути FABP5/PPAR β/δ . С учетом наибольшей аффинности CRABP1 к РК, секвестрирование ее в цитоплазме белком CRABP1 ограничивает связь CRABP2-РК.

Суммируя все вышеописанное, гипотетическая схема активности РК-связывающих белков представлена на рисунке 6.



Считается, что CRABP2 связывает РК и доставляет ее в ядро, где происходит RAR-зависимая активация про-апоптотических генов. Основной функцией CRABP1 согласно данной модели, является секвестрирование РК в цитоплазме и предотвращение ее попадания в ядро. FABP5 связывает РК с самой низкой аффинностью, но транспортирует ее в ядро и взаимодействует с PPAR δ / β , который активирует анти-апоптотические гены. Адаптировано из [125]

Рисунок 6 - Гипотетическая роль белков семейства iLBP в реализации активности РК и процессе канцерогенеза

1.5 Роль CRABP1 и CRABP2 в канцерогенезе

1.5.1 CRABP2 в клетках злокачественных опухолей

Роль CRABP2 в канцерогенезе неоднозначна. Для большинства нозологий показана его опухоль-супрессорная активность, реализуемая прежде всего с помощью активации RAR-зависимой экспрессии генов, а также с помощью других механизмов, описанных выше. Так, например, в одной из работ была продемонстрирована рост-ингибирующая активность CRABP2 в клетках эндометрия. Авторами было показано, что экспрессия CRABP2 в эндометриальных стромальных клетках (ESC) выше по сравнению с эндометриозными стромальными клетками (OSIS). В то же время в клетках OSIS соотношение CRABP2:FABP5 было ниже по сравнению с клетками ESC. Нокдаун CRABP2 в клетках ESC приводит к стимуляции пролиферации и повышению экспрессии анти-апоптотических генов, а нокдаун FABP5 в клетках OSIS, наоборот, приводит к подавлению пролиферации и снижению экспрессии анти-апоптотических

генов. При этом в обоих случаях подавления экспрессии белков уровень матричной РНК соответствующих ядерных рецепторов RAR и PPAR α не меняется, что указывает на важную роль белков-транспортеров РК в ядро в ретиновом сигналинге. Авторы делают вывод, что сигнальный путь от РК, проходящий через CRABP2 – апоптотический, тогда как путь FABP5 – анти-апоптотический [163]. Совсем недавно было выяснена взаимосвязь данных сигнальных путей. В одном из исследований показано, что фактор KLF2 (Kruppel-like factor 2) индуцирует экспрессию CRABP2 и RAR и ингибирует FABP5 и PPAR β/δ . Таким образом, можно сказать, что KLF2 переключает действие РК с протуморогенного пути (FABP5/PPAR β/δ) на опухоль-супрессорный (CRABP2/RAR) [246]. Сходные данные получены той же группой авторов при исследовании роли белков CRABP в патогенезе рака молочной железы. В частности, авторы показали, что накопление CRABP1 имеет место в цитоплазме клеток гормон-резистентных опухолей и ассоциировано с плохим прогнозом, в то время как накопление CRABP2 в ядре характерно для клеток ER+ и PR+ опухолей и коррелирует с лучшей выживаемостью. Подавление CRABP1 приводит к повышению, а подавление CRABP2 - к снижению активности RAR при обработке РК. Интересно, что обработка РК приводила к перемещению в ядро CRABP2, но не CRABP1. Более того, гиперэкспрессия CRABP1 приводила к отмене транслокации CRABP2 в ядро. В целом авторы утверждают, что CRABP1 подавляет действие РК, снижая ее попадание в ядро с помощью различных механизмов, в том числе за счет уменьшения доступа CRABP2 в ядро [125].

Приведенные выше данные свидетельствуют о том, что CRABP2 при транслокации в ядро супрессирует рост опухолей путем доставки РК к RAR. Согласно более поздним данным, CRABP2 имеет и дополнительные функции, будучи не связанным с РК, что также оказывает опухоль-супрессорный эффект на малигнизированные клетки. Так, было обнаружено, что в отсутствие РК свободный CRABP2 связывается в цитоплазме с белком HuR, способствуя его активации, а связывание с РК стимулирует диссоциацию комплекса CRABP2-HuR, что приводит к «открытию» сигнала ядерной локализации и транспортировке комплекса CRABP2-РК в ядро. РК-независимое взаимодействие с CRABP2 приводит к увеличению содержания в клетке ряда мишеней HuR, включая основной белок апоптоза, Araf-1, активирующий апоптотические пептидазы (apoptotic peptidase-activating factor 1). Таким образом было показано РК- и RAR-независимое, но CRABP2-зависимое увеличение активности Araf-1 как в культуре клеток, так и *in vivo* [61, 224]. HuR непосредственно не регулирует импорт CRABP2 в ядро, но предположительно участвует в регуляции размера пор в ядерной мембране. На модели ксенографтов карциномы молочной железы мыши было показано, что CRABP2 непосредственно взаимодействует с HuR, и это взаимодействие увеличивает аффинность HuR к целевым транскриптам, включая мРНК Araf-1, каспазы 7, и самого HuR, а также усиливает

способность CRABP2 подавлять пролиферацию клеток карциномы молочной железы. Более того, подавление экспрессии NuR снижает CRABP2-опосредованное ингибирование роста опухоли. Таким образом, авторы утверждают, что CRABP2 может осуществлять функцию опухолевого супрессора по 2 механизмам: с помощью активации RAR в ядре, либо посредством взаимодействия с NuR в цитоплазме. При этом второй механизм может быть даже более важным с точки зрения участия CRABP2 в опухолевой супрессии [223]. Также в одной из работ показано, что в клетках плоскоклеточного рака пищевода (ESCC) экспрессия CRABP2 значительно снижена по сравнению с нормальной тканью как на уровне мРНК, так и на уровне белка. На модели клеточной линии рака пищевода EC109 показано, что гиперэкспрессия CRABP2 приводит к снижению пролиферации, миграционной активности клеток и усилению апоптоза в них. Более того, инъекция клеток с гиперэкспрессией CRABP2 приводила к снижению размера опухоли у мышей. Таким образом, в опухолях данного типа CRABP2 проявляет активность опухолевого супрессора, а снижение его экспрессии может служить маркером заболевания [240].

Тем не менее, для отдельных нозологий, среди которых нейробластома и глиобластома, было показано, что CRABP2 оказывает опухоль-промотирующее воздействие, и его экспрессия ассоциирована с высокой степенью злокачественности и неблагоприятным прогнозом [91, 126]. Также, повышение продукции CRABP2 коррелирует с негативным прогнозом для некоторых форм рака кожи. Так, в работе Vahlquist с соавторами, было показано, что экспрессия CRABP2 в тканях кератоакантомы, плоскоклеточной карциномы и себорейного кератоза была выше, чем в нормальной ткани. Экспрессия CRABP2 в ткани базальноклеточной карциномы не отличалась от экспрессии данного белка в нормальной ткани [219]. Вскоре было продемонстрировано, что подавление CRABP2 способствует уменьшению инвазивной активности клеток плоскоклеточного рака головы и шеи [25, 222]. Повышение продукции данного белка показано для клеток ОПЛ [56, 252], лейомиомы матки [215], а также высокоинвазивных клеток ретинобластомы [136]. Интересно, что в клетках нейробластомы CRABP2 является мишенью онкогена *MycN*. Более того, CRABP2 экспрессируется на высоком уровне в клетках нейробластомы только в случае амплификации *MycN*, который является показателем агрессивности данного типа опухолей. Регулируемая индукция и подавление *MycN* в клеточных линиях нейробластомы приводит к соответствующим изменениям экспрессии CRABP2. Авторы предполагают, что транскрипционный фактор *MycN* связывается с промотором гена CRABP2, в котором обнаружена соответствующая последовательность, и активирует его транскрипцию. Эти данные говорят о том, что CRABP2 может быть потенциальной мишенью для таргетных препаратов в лечении нейробластомы [91]. Экспрессия CRABP2 существенно повышается в условиях гипоксии, которая индуцирует сигналы

выживания в клетках гепатокарциномы. Такие клетки становятся устойчивыми к РК-индуцированному апоптозу. Было выяснено, что РК-зависимая активация PI3K/AKT и p42/44 MAPK связана с этой резистентностью клеток. При индуцированной гипоксией экспрессии CRABP2 апоптоз снижается. В свою очередь, ингибирование CRABP2 стимулирует РК-индуцируемый апоптоз и делает клетки более чувствительными к действию РК, подавляя активацию p42/44 MAPK и AKT [120]. Другое исследование, проведенное на образцах тканей гепатоцеллюлярной карциномы и на модели клеточных линий HepG2, L-02 и Huh7, подтвердило опухоль-проторную роль CRABP2 в опухолях данного происхождения. Так, авторы показали, что экспрессия CRABP2 в клинических образцах коррелирует со стадией заболевания – продукция данного белка повышалась пропорционально увеличению стадии. Подавление CRABP2 в клетках HepG2 и Huh7 ингибирует пролиферацию, миграцию, инвазию и способность к автономному росту, а также стимулирует апоптоз, о чем свидетельствуют повышение экспрессии активированной каспазы-3, Вах и снижение продукции Bcl-2. Вдобавок, инъекция клеток HepG2 с нокдауном CRABP2 приводит к значимому уменьшению объема опухолей у мышей по сравнению с опухолями, вызываемыми инъекцией клеток без подавления экспрессии данного белка [40]. Xiao и коллегами в 2014 году было проанализировано распределение CRABP2 в клетках дуктальной аденокарциномы (PDAC) поджелудочной железы, в нормальных клетках поджелудочной железы и в клетках поджелудочной железы больных хроническим панкреатитом. Авторы показали, что CRABP2 детектируется только в опухолевых клетках. Судя по всему, CRABP2 специфически экспрессируется на высоком уровне в клетках PDAC. Таким образом, гиперэкспрессия CRABP2 – это позднее событие канцерогенеза поджелудочной железы, и она может быть использована в качестве маркера PDAC [136]. Высокий уровень CRABP2 продемонстрирован при раке мочевого пузыря [109]. CRABP2 в клетках пациентов с мультиформной глиобластомой (GBM) в основном находится в цитоплазме, и именно цитоплазматический уровень данного белка ассоциирован с низкой выживаемостью. Воздействие на клетки РК вызывает увеличение уровня CRABP2 в цитоплазме, при этом нокдаун гена CRABP2 – ингибирование пролиферации клеток глиобластомы и активацию RAR посредством РК. Предполагается, что CRABP2 в клетках GBM секвестрирует РК в цитоплазме и активирует антиапоптотический сигналинг, предотвращая РК-зависимые апоптоз и клеточную дифференцировку [126].

1.5.2 CRABP1 в клетках злокачественных опухолей

Существует немало данных, указывающих на опухоль-прототирующую активность CRABP1. В исследовании на модели *in vivo* авторы показывают, что эктопическая экспрессия

CRABP1 в яйцеклетке приводила к внешне нормальному развитию мышей, но они не доживали до 7-9 месяцев. Исследователи детектировали образование катаракты в возрасте 5 месяцев, однако истинной причиной смерти мышей был рак поджелудочной железы. Иммуногистохимический анализ ткани поджелудочной железы выявил множественные метастазы данной опухоли в лимфатические узлы, а также показал, что она развивалась из островков Лангерганса. Примечательно, что трансгенная мРНК CRABP1 детектировалась в клетках рака поджелудочной железы, в то время как в нормальной ткани мРНК данного гена отсутствовала [166]. В свою очередь, на клетках нейроэндокринных опухолей поджелудочной железы человека было продемонстрировано, что высокий уровень экспрессии CRABP1 ассоциирован с метастазами в лимфатических узлах и снижением степени дифференцировки [111]. Для некоторых злокачественных новообразований головного мозга повышенный уровень CRABP1 рассматривается как фактор негативного прогноза, а его экспрессия в тканях НМРЛ ассоциирована со снижением урона общей выживаемости пациентов [131]. Значительное увеличение экспрессии гена *CRABP1* показано для тканей лейомиомы матки [237], а также рака яичника эндометриоидного подтипа [16]. Гиперэкспрессия *CRABP1* также обнаруживается в клетках злокачественных опухолей нервных оболочек и синовиальных саркомах [73, 105, 111].

Однако есть и немало статей, подтверждающих опухоль-супрессирующую функцию CRABP1. Например, уменьшение уровня CRABP1 обнаружено при раке щитовидной железы. Более того, снижение экспрессии данного белка предлагается в качестве диагностического маркера для папиллярной карциномы щитовидной железы [93]. Отсутствие экспрессии CRABP1 ассоциировано с регионарным метастазированием и низкой степенью дифференцировки клеток при плоскоклеточном раке пищевода. Более того, экзогенная экспрессия CRABP1 в линиях KYSE-30 и KYSE-510 рака пищевода снижает рост и клоногенность клеток и сопровождается увеличением экспрессии белков регуляторов клеточного цикла, p21 и p27, известных своей опухоль-супрессирующей активностью [205].

Достаточно неоднозначна роль CRABP1 в развитии рака яичников. В 2010 году Banz с коллегами с помощью микрочипов проанализировали экспрессию мРНК различных генов, в том числе CRABP1, в клетках рака яичников, ассоциированного с эндометриозом (ЕАОС), в клетках карциномы яичников (ОС) и в нормальных клетках яичников. Уровень мРНК CRABP1 в ОС и ЕАОС была выше более чем в 100 раз, по сравнению с эндометриоидными клетками и более чем в 150 раз – по сравнению с нормальной тканью яичников, что указывает на проявление опухоль-промоторной активности белка CRABP1. С другой стороны, результаты опубликованного годом позже иммуногистохимического исследования CRABP1 в тканях рака яичника выявили снижение экспрессии в половине образцов серозной аденокарциномы и в 38% светлоклеточной аденокарциномы яичников. Авторы данной работы показали связь низкого

уровня CRABP1 с негативным прогнозом для пациентов с данными гистологическими формами рака яичника [141]. Однако стоит отметить, что авторы не анализировали локализацию CRABP1, что было бы интересно с учетом данных [125], свидетельствующих о различной роли CRABP1 в патогенезе РМЖ в зависимости от того, находится ли он в ядре или цитоплазме.

Примечательно, что как уже говорилось, по данным ряда работ промотор гена CRABP1 гиперметилирован во многих опухолях, причем метилирование коррелировало со степенью злокачественности опухоли [93, 103, 119, 124, 205]. Это подтверждается и нашими данными об отсутствии экспрессии этого гена в целом ряде линий опухолевых клеток различного происхождения (линии НМРЛ различного гистогенеза, глиобластомы, некоторые линии меланомы, рака яичника и др.). В контексте исследования изменения экспрессии CRABP1 особый интерес представляет работа Celestino и коллег, в которой проводилось сравнение экспрессии данного гена в образцах тканей различных гистологических типов рака щитовидной железы. Авторы показали, что для папиллярной и фолликулярной карциномы характерно снижение уровня мРНК CRABP1 по сравнению с фолликулярной аденомой – доброкачественной опухолью щитовидной железы. Уровень экспрессии CRABP1 *in vitro* в клетках карциномы щитовидной железы также был снижен в сравнении с нормальной тканью щитовидной железы (ЩЖ) [35]. По данным этой работы, экспрессия мРНК CRABP1 снижается пропорционально повышению злокачественности клеток (самая высокая – в образцах нормальных клеток ЩЖ, самая низкая в клеточных линиях РЩЖ). Для злокачественных новообразований толстой кишки было показано снижение экспрессии CRABP1 по сравнению с доброкачественными новообразованиями, что также свидетельствует скорее об опухоль-супрессорной функции данного белка. Кроме того, показано гиперметилирование промотора *CRABP1* при данном типе заболеваний, которое встречалось примерно в половине случаев карцином толстой кишки и лишь в 11% образцов аденом [8]. Снижение экспрессии CRABP1 за счет гиперметилирования промотора было показано и для злокачественных опухолей печени [119].

Согласно нашей гипотезе, подавление CRABP1 является вторичным событием и происходит в процессе опухолевой прогрессии. Это может быть связано с отсутствием необходимости в секвестрировании РК и ограничении ее опухоль-супрессорного действия, когда опухолевая клетка становится нечувствительной к РК. Также в ходе прогрессии теряется и взаиморегуляция между CRABP1 и CRABP2, о которой было сказано выше.

Интересно, что CRABP1 негативно регулируют секрецию экзосом клетками нейронов (клеточная линия нервных клеток гиппокампа HT-22). Белок RIP140, провоспалительный регулятор, транспортируется из нейронов в макрофаги, приводя к воспалительной поляризации последних. Показано, что в крови и спинно-мозговой жидкости мышей с нокаутом CRABP1

значительно повышено присутствие экзосом, содержащих RIP140, что приводило к усилению системного воспаления. Примечательно, что эффект подавления воспаления, согласно данным работы, реализуется при связывании РК с CRABP1, приводит к ингибированию Ras-Raf-MEK-ERK-сигналинга, происходит в течение нескольких минут и, возможно, свидетельствует о неканонической активности РК, в то время как классическая ядерная РК-активация генов опосредуется взаимодействием CRABP2 и длится несколько дней [123].

В одной из работ показано, что подавление экспрессии CRABP1 в клетках гепатоцеллюлярной карциномы Huh7 и HepG2 приводит к снижению уровня холестерина в них, в то время как гиперэкспрессия данного белка приводит к значительному повышению уровня холестерина (Рисунок 7). Помимо нокдауна данного белка с помощью лентивирусной трансфекции авторы также исследовали влияние мапротилина на активность CRABP1. Данное вещество может напрямую связывать CRABP1, подавляя его опухоль-промоторную функцию в данных клетках. Обработка клеток мапротилином приводит к снижению количества активных (фосфорилированных) форм белков SREBP2 и ERK, что приводит к снижению уровня холестерина, индукции апоптоза, подавлению роста и снижению метастатической активности клеток ГЦК [251]. Авторы показывают, что мапротилин действительно способен связывать свободный CRABP1, который был выделен из клеток. Однако неизвестно, насколько сильно данное вещество ингибирует активность CRABP1 внутри клетки, и происходит ли это при прямом взаимодействии или опосредованно.

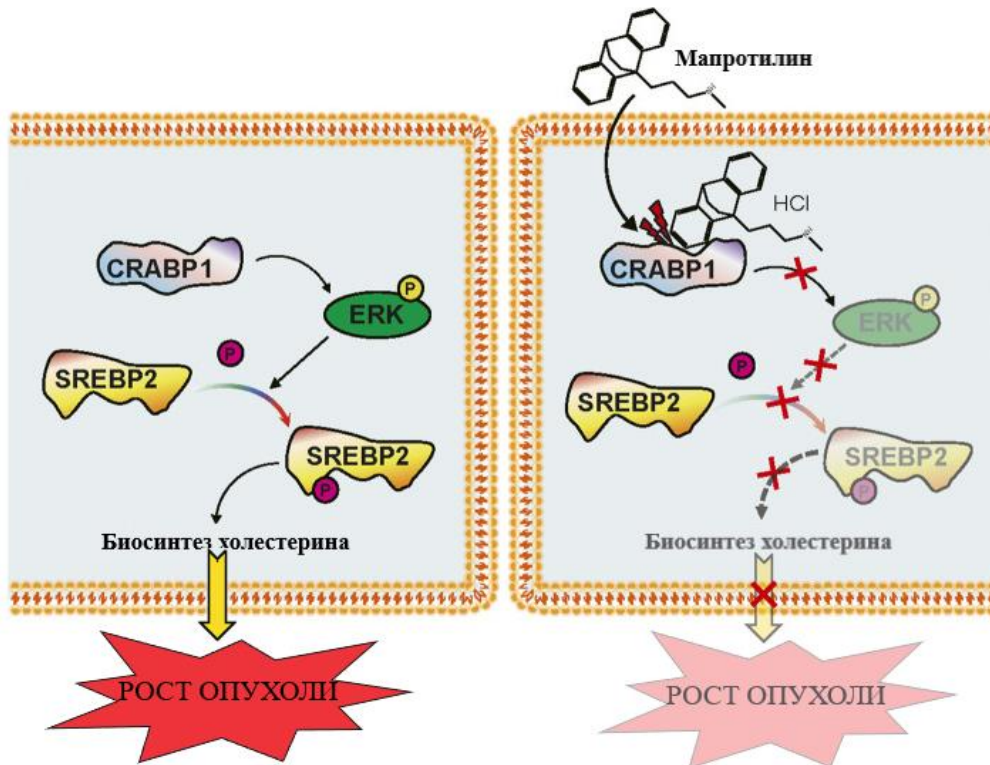


Рисунок 7 - Гипотетическая функция CRABP1 в регуляции опухолевого роста посредством регуляции синтеза холестерина, подробности в тексте. Адаптировано из [251]

Помимо описанных механизмов действия CRABP1 в отношении активности РК связанных с ее секвестрированием и возможной стимуляцией катаболизма, есть и данные, свидетельствующие об участии данного белка в реализации неканонической активности РК.

Так, Persaud с коллегами выявили участие белка CRABP в реализации «негеномной» активности РК в отношении RAR-независимого активирующего фосфорилирования протеинкиназы ERK1/2 в цитоплазме эмбриональных стволовых клеток. Так, авторами были выявлены два пика ATRA-зависимого фосфорилирования данной киназы – краткосрочное, возникающее при инкубации с РК до одного часа, и отложенное, то есть появляющееся после 8 часов инкубации с ATRA. Второе соответствует транскрипционной РК-зависимой активации ERK1/2 и не требует участия CRABP1. В тоже время, согласно результатам данной работы, CRABP1 необходим для проведения краткосрочной (то есть нетранскрипционной) активации ERK1/2. Важно подчеркнуть, что подавление экспрессии RAR не влияло на эффект краткосрочной активации ERK1/2, данный эффект также не был связан с основным механизмом активации ERK1/2 с помощью классического MAP-киназного каскада. Как результат обнаруженной РК-CRABP1-зависимой нетранскрипционной активации ERK1/2, авторы показали накопление белка p27 в ядре клеток и задержку прохождения клеточного

цикла в фазе G₁. Впоследствии авторы на той же экспериментальной модели определили дополнительный эффект CRABP1-зависимой краткосрочной активации ERK1/2, а именно, активацию фосфатазы PP2A, которая с помощью дефосфорилирования белка p27 активирует процесс апоптоза или способствует аресту клеток в G₁ фазе (Рисунок 8). Таким образом, авторы предполагают опухоль-супрессорное значение неканонической активности РК, реализуемой с помощью CRABP1 [168, 169].

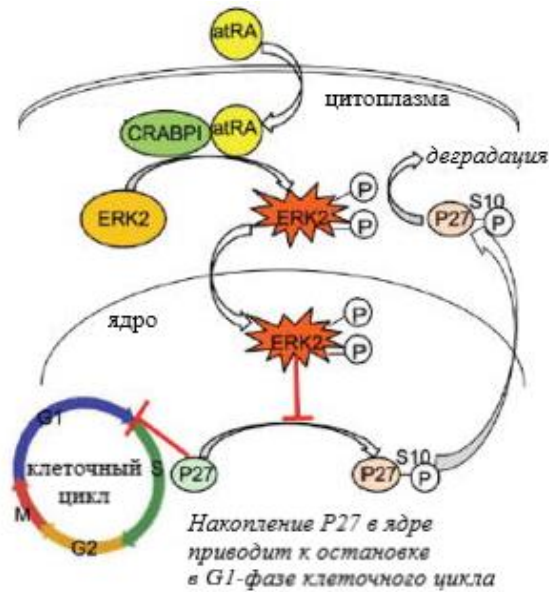


Рисунок 8 - Один из возможных механизмов неканонической активности РК и участие CRABP1 в нем. Подробности в тексте. Адаптировано из [168]

Более того, важнейшим результатом работы, проведенной на клеточной линии рака яичника мыши, было обнаружение того, что РК-зависимая активация ERK1/2 требует участия CRABP1 и не наблюдается в его отсутствии [168].

Имеется и альтернативная гипотеза участия CRABP1 в реализации неканонической активности РК. Так, показано, что в эмбриональных стволовых клетках ESC CRABP1 с помощью конкурентного механизма приводит к «частичной» (неполной) активации MEK1/2 и, как следствие, недостаточной активности ERK1/2, что приводит к снижению пролиферации клеток. В то же время в отсутствие экспрессии CRABP1 происходит полное фосфорилирование киназ MEK1/2 и ERK1/2, что приводит к повышению пролиферации клеток (Рисунок 9). Авторы работы объясняют данный феномен тем, что CRABP1 в присутствии ATRA и других ретиноидов способен связываться с RBD доменом протеинкиназы c-RAF, тем самым препятствуя ее связыванию с Ras-GTP, которая ее активирует. Данные события негативно

вливают на способность c-RAF фосфорилировать киназу MEK1/2, которая в свою очередь, является активатором ERK1/2 [148, 233].

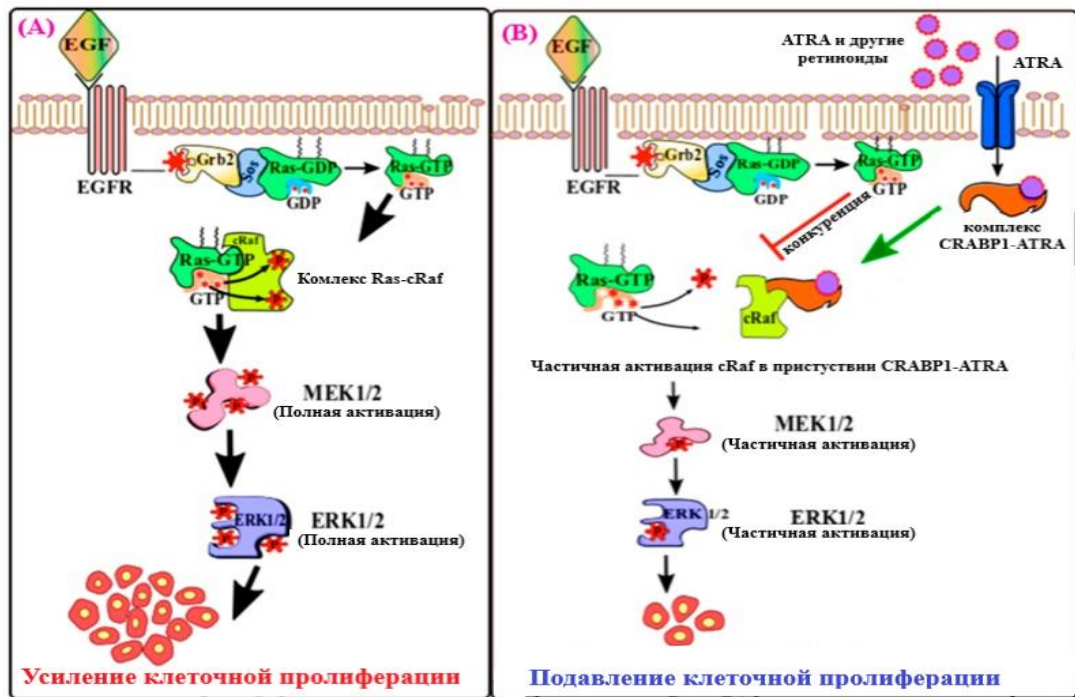


Рисунок 9 - Один из гипотетических механизмов влияния CRABP1-РК на классический MAPK-сигналинг. Адаптировано из [148]

1.6 Гипотезы формирования резистентности клеток к РК

Как уже говорилось ранее, несмотря на успешное применение АТРА и других ретиноидов в терапии некоторых злокачественных новообразований (например, ОПЛ), использование АТРА для лечения множества других неопластических заболеваний либо не приводило к успеху, либо даже способствовало росту и прогрессии опухолей [33, 55]. Механизмы резистентности к ретиноидам до сих пор малопонятны, однако на сегодняшний день имеется ряд гипотез, объясняющих данный феномен. Согласно одной из них, РК-резистентность возникает вследствие нарушений классического ретиноевого сигналинга - снижения экспрессии ядерных рецепторов RAR, РК-активация которых приводит к транскрипции апоптотических генов, либо «переключения» различных рецепторов РК. Другая гипотеза связана с ограничением доступа РК в ядро, которая может реализовываться за счет снижения активности РК-связывающих белков (CRABP). Третья гипотеза состоит в усилении катаболизма и/или снижении синтеза РК, что способствует уменьшению ее внутриклеточной

концентрации, и как следствие, ингибированию ее опухоль-супрессорной активности. Последним возможным механизмом устойчивости клеток к РК и другим ретиноидам является неканоническая активность ретиноевой кислоты, которая приводит к нетранскрипционной активации важнейших киназ (АКТ, ERK, p38MAPK), способствуя выживанию клетки и уходу от апоптоза.

1.6.1 Гипотеза нарушения классического ретиноевого сигналинга

Снижение активности или «переключение» рецепторов РК может являться одной из причин формирования РК-резистентности за счет нарушения проведения канонической транскрипционной активности РК. Так, например, предполагается, что снижение экспрессии и/или функциональной активности RAR α и, как следствие, снижение экспрессии регулируемого этим белком рецептора RAR β , может вносить вклад в формирование устойчивости клеток к РК [49, 183].

Связь RAR α с чувствительностью к РК и другим ретиноидам была открыта давно и хорошо изучена на модели ОПЛ. В этих опухолях часто происходит транслокация, приводящая к образованию химерного белкового продукта PML и RAR α , что препятствует проведению классического ретиноевого сигналинга и нормальной клеточной дифференцировке. При обработке оксидом мышьяка происходит его связывание с PML, что стимулирует диссоциацию комплекса и высвобождение RAR α , позволяя рецептору активировать транскрипцию продифференцировочных генов. Более того, добавление ATRA в схему для химиотерапии данного заболевания приводит к комбинированному эффекту за счет усиления активности RAR α . Исходя из этого ATRA была использована для терапии множества новообразований, в которых экспрессируется RAR α . В начале данный изомер РК использовался для лечения различных подтипов ОПЛ, и на данной модели была показана корреляция между экспрессией RAR α и ответом на РК. В клетках с повышенной экспрессией данного ядерного рецептора обработка ATRA вызывала сильное подавление пролиферации, в то время как некоторые типы ОПЛ с пониженной продукцией RAR α реагировали на ретиноидную терапию слабо [38, 47, 85, 248]. В дальнейшем предпринимались попытки лечения различных типов солидных опухолей с помощью ATRA.

Связь между экспрессией RAR α и РК-чувствительностью показана также на модели клеточных линий рака желудка. Так, гиперэкспрессия данного белка в клетках MKN-45 приводила к усилению ATRA-индуцированного подавления пролиферации и автономного роста путем регуляции активности транскрипционного фактора AP-1 [234].

В эксперименте с использованием отдельных клеточных линий РМЖ показано, что экспрессия RAR α коррелирует с чувствительностью клеток к действию РК. В клетках с высокой экспрессией данного белка ATRA снижает клеточную пролиферацию и стимулирует апоптоз, в то время как на клетки с низкой продукцией RAR α данный изомер РК не влияет [9].

Показано, что в клетках РМЖ с высоким базальным уровнем RAR α (SKBR3) подавление экспрессии данного белка приводило к усилению рост-супрессорного действия ATRA [27].

Показана связь коэкспрессии рецепторов HER2 и RAR α с чувствительностью клеток РМЖ к РК. Клетки с высокой экспрессией данных белков (SKBR3, AU565, UACC812) обладают повышенной чувствительностью к действию ретиноевой кислоты. Комбинированное использование лапатиниба (ингибитора HER2) в сочетании с ATRA приводит к еще большему снижению пролиферации этих клеток, в то время как на РК-устойчивые клетки, характеризующиеся низкой экспрессией HER2 и RAR α или ее отсутствием (MDA-MB-453, MDA-MB-231), эта комбинация не оказывает такого действия [160].

Некоторые исследования свидетельствуют о том, что потеря экспрессии ключевых генов приводит к нарушению регуляции ретиноевого сигналинга. Авторы одной из таких работ говорят о том, что мутации в гене APC при раке толстой кишки приводят к развитию РК-резистентности у опухолевых клеток счет повышения экспрессии CYP26A1 или снижения экспрессии RAR α и RAR β . Также в данной работе показано, что низкий уровень RAR и RXR, помимо РК-резистентности, связан с плохим прогнозом для пациентов. На основе данных биоинформатического анализа авторы предполагают, что потеря экспрессии этих ядерных рецепторов может быть связана с мутациями в этих генах [155].

В одной из работ был показан новый механизм регуляции активности ядерных рецепторов с помощью белка RaRF (RA resistance factor). Этот белок был открыт с помощью дрожжевой двугибридной системы как белок, взаимодействующий с эстроген-родственным рецептором ERR α (estrogen-related receptor) и подавляющий его транскрипционную активность [217]. В другой работе была обнаружена корреляция экспрессии RaRF в клетках лейкемии с их резистентностью к действию РК. Аналогично тому, что было показано в работе 2012 года, авторы обнаружили, что белок RaRF в ответ на обработку РК непосредственно взаимодействует с RAR и секвестрирует его в ядре, препятствуя его активности [244].

Интересно, что среди приведенных выше рецепторов RAR, белок RAR β известен в качестве опухолевого супрессора в эпителиальных клетках [78, 127, 183, 207]. Например, есть данные о том, что гиперэкспрессия RAR β может активировать процесс апоптоза, причем как по РК-зависимому, так и РК-независимому механизму, а также стимулировать арест клеточного цикла [127]. Кроме того, на модели клеточных линий меланомы, различающихся по чувствительности к РК, была показана обратная корреляция между активностью RAR и

уровнем реактивных форм кислорода. Авторы предполагают, что оксидативный статус клеток меланомы может влиять на активность RAR и участвовать в РК-резистентности [57]. Опухоль-супрессорная роль RAR β показана и для многих линий клеток рака пищевода. Так, в линиях с высокой экспрессией данного белка ATRA вызывала подавление пролиферации и апоптоз, в то время как в клетках, где RAR β отсутствовал, данный изомер РК не оказывал такого действия [238].

Наиболее распространенным видом негативной регуляции экспрессии RAR β , реализуемой на ранних стадиях прогрессии солидных опухолей, принято считать его эпигенетическое подавление с помощью метилирования промотора и компактизации хроматина [196, 197]. Например, метилирование промотора RAR β коррелирует с плохим прогнозом при раке простаты, в нескольких работах показано, что эпигенетическая регуляция данного гена происходит в процессе малигнизации клеток [21, 96]. Есть и попытки связать потерю функциональной активности RAR β с резистентностью к РК. Так, авторы одной из работ предполагают, что метилирование RAR β в клетках РМЖ связано с РК-резистентностью [49]. Данный ген также метилирован во многих клеточных линиях рака легкого (H416, H661, SK-MES-1), что может быть являться причиной их высокой устойчивости к действию РК и других ретиноидов [249]. По многочисленным данным, свидетельствующим как о низкой экспрессии RAR β , так и о гиперметилировании промотора данного гена в клетках рака легкого, уровень RAR β обратно пропорционален злокачественности данного типа опухолей. Также известно, что использование ретиноидов в терапии рака легкого, а также обработка ATRA клеточных линий не приводит к снижению роста опухоли и пролиферации клеток, что может быть связано со значительным подавлением экспрессии RAR β [102, 225, 250].

Существует и другая точка зрения в отношении роли данного ядерного рецептора в РК-резистентности. Она основана на том, что RAR β существует в виде нескольких изоформ, соотношение экспрессии которых существенно влияет на ответ на РК. Например, показано, что в клетках РМЖ практически отсутствует экспрессия RAR β 2, что связано прежде всего не со специфическими мутациями данного гена, а с гиперметилированием промотора P2 [196, 197]. Повышение экспрессии с помощью трансдукции или активация данного белка ретиноидами приводили к повышению РК-чувствительности клеток, что выражалось в снижении пролиферации и метастатического потенциала, а также повышении количества апоптотических клеток при обработке РК [192, 214]. В этой связи были предприняты попытки использования индукции экспрессии RAR β 2 для лечения и даже предотвращения развития не только РМЖ, но и других злокачественных заболеваний [11]. Другая изоформа - RAR β 4 - является продуктом альтернативного сплайсинга RAR β 2 [149]. В целом считается, что обе изоформы, RAR β 2 и RAR β 4, обладают одинаковыми функциями, так как одинаково продуцируются в ответ на

стимуляцию ретиноидами, а индукция их экспрессии приводит к снижению пролиферации клеток и запуску апоптоза в них [39, 203]. Однако имеются некоторые немногочисленные работы, свидетельствующие о разной роли данных изоформ в канцерогенезе. Так, в одной из работ показано, что повышение экспрессии RAR β 4 на фоне снижения RAR β 2 приводило к приобретению клетками резистентности к ретиноидам, в то время как клетки, экспрессирующие только RAR β 2, оказались более чувствительными к действию ретиноидов [94]. В литературе также имеются немногочисленные исследования участия RAR β 5 изоформы в ПК-резистентности [44]. Авторы считают, что RAR β 5 имеет свой отдельный промотор P3, не имеющий последовательности RARE, в то время как остальные известные изоформы RAR β транскрибируются с промоторов P1 и P2. Также интересно, что на N-конце последовательности RAR β 5 полностью отсутствует домен AF-1 и частично ДНК-связывающий домен, характерные для RAR β 2 и RAR β 4. Данный белок имеет массу 37 кДа, и по структуре близок к RAR β (40,6 кДа), который экспрессируется в некоторых линиях РМЖ и негативно регулирует ПК-зависимую транскрипцию генов [39].

Также имеются данные, в которых оба белка, RAR α и RAR β , были рассмотрены в рамках одной работы, а в некоторых из них была показана взаимосвязь этих белков и ПК-резистентности. Например, в нескольких работах показано, что RAR β -зависимая трансактивация экспрессии генов, вовлеченных в дифференцировку, апоптоз и подавление роста клеток, регулируется и активностью RAR α , поскольку транскрипция RAR β активируется лишь после связывания лиганд (ПК)-активированного RAR α с RARE последовательностью в промоторе RAR β [13, 32, 207].

Существуют и иные доказательства вовлеченности рецепторов RAR в чувствительность к ПК. Например, клеточные линии рака пищевода Т-1 и Т-8, устойчивые к ПК, демонстрируют подавление экспрессии RAR β . В то же время, в клетках линий Т-2, Т-3, Т-7, Т-12 и Т-13, характеризующихся высокой ПК-чувствительностью, наблюдается высокий уровень экспрессии RAR β [238]. Результаты исследований на модели нейробластомы, относящейся к наиболее ПК-чувствительным типам солидных опухолей, свидетельствуют о том, что про-апоптотическая функция ПК связана с протеосомной деградацией RAR α . Кроме того, экзогенная экспрессия RAR α приводит к увеличению ПК-чувствительности клеток нейробластомы [147].

Во многих клеточных линиях РМЖ экспрессия RAR β низкая или отсутствует (например, в линиях MCF7, SKBR3, MDA-MB-231), некоторые линии (MCF7, SKBR3) обладают повышенной экспрессией RAR α . При этом интересно, что во всех исследованных линиях стимуляция клеток АТРА приводила к снижению экспрессии RAR α , в то время как экспрессия RAR β либо не менялась, либо повышалась (HCC1599, MB157). Такой результат противоречит общепринятым данным о взаимосвязи экспрессии этих ядерных рецепторов, а также

повышению их продукции при обработке клеток ретиноевой кислотой. Помимо этого, авторы показывают, что подавление экспрессии белка $RAR\beta$ с помощью shRNA приводит к тому, что линии HCC1599 и MB157 становятся более устойчивыми к действию ATRA [161].

Гиперэкспрессия протеинкиназы PKCa в клетки T47D и MDA-MB-231 приводит к усилению ATRA-индуцированной экспрессии $RAR\alpha$, что способствует повышению чувствительности T47D к ATRA, в то время как устойчивость клеток MDA-MB-231 не меняется. Лечение мышей с помощью ATRA после инъекции опухолевых клеток LM-3 с гиперэкспрессией PKCa снижает объем опухолей. В этой же работе показано, что гиперэкспрессия $RAR\beta$ в клетки MDA-MB-231 приводит к снижению пролиферации данной линии в сравнении с контролем, но не оказывает значимого влияния на устойчивость данных клеток к действию РК. [17].

1.6.2 Участие коактиваторов - белков семейства iLBP, связывающих РК

Несмотря на очевидную значимость CRABP1 и CRABP2 в реализации клеточного ответа на РК, исследований значения этих белков в развитии резистентности к РК крайне мало. В соответствии с нашей гипотезой и согласно нашим данным, в клетках, считающихся чувствительными к РК, экспрессия CRABP1 присутствует (линия MCF7 рака молочной железы, линии клеток нейробластомы), в то время как РК-резистентные клетки (линии HMPJL, глиобластомы) характеризуются отсутствием этого белка. Можно предположить, что CRABP1 в нормальных клетках поддерживает баланс активности РК, в трансформированных клетках на ранних стадиях малигнизации его экспрессия способствует секвестрированию РК в цитоплазме, негативной регуляции CRABP2, и, возможно, активации факторов, способствующих формированию РК-резистентности (повышению активности ферментов катаболизма, снижению активности РК-синтезирующих ферментов, возможно снижению активности рецепторов RAR). На поздних стадиях прогрессии и/или в РК-резистентных клетках его экспрессия теряется. Имеющиеся единичные литературные данные свидетельствуют в пользу такой гипотезы. Так, на клеточной линии рака шейки матки, чувствительной к действию РК, показано, что гиперэкспрессия CRABP1 приводит к формированию РК-резистентного фенотипа [18]. Также некоторые данные говорят о ярко выраженном снижении чувствительности к РК при гиперэкспрессии CRABP1 в линии рака почки A-498 в сравнении с контрольной линией, в которой данного белка нет [171].

В отношении связи CRABP2 с РК-чувствительностью имеются данные о том, что стабильная экспрессия CRABP2 в клетках рака молочной железы SC115 способствовала активации RAR, значительно повышающего чувствительность клеток к РК-индуцируемому

ингибированию роста, и подавляла туморогенность клеток у мышей с иммунодефицитом. В частности, инъекция аденовируса, экспрессирующего CRABP2, в карциномы молочной железы мыши существенно замедляла рост опухоли [91].

В одной из работ на линии MCF7, экспрессирующей оба гомолога на высоком уровне, показано, что подавление CRABP1 приводит к сенсibilизации клеток к действию ATRA, в то время как ингибирование CRABP2 приводит к обратному эффекту – клетки демонстрируют высокую РК-резистентность. Интересно, что авторы связывают данный эффект с изменением РК-индуцированной активации ядерных рецепторов RAR: при подавлении CRABP1 она повышается, а при подавлении CRABP2 – снижается. Такой же эффект авторы наблюдают и на модели других клеточных линий: гиперэкспрессия CRABP1 в клетки различных подтипов с низким базальным уровнем экспрессии данного белка (SKBR3, BT549, Hs578T) приводит к снижению РК-индуцированной активации RAR. Авторы полагают, что экспрессия CRABP1 и FABP5 выше в РК-устойчивых клетках, а CRABP2 – в РК-чувствительных, а также приводят гипотезу о взаимосвязи этих белков с РК-резистентностью. Согласно ей, белки CRABP1 и FABP5 являются опухолевыми промоторами, первый за счет секвестрирования РК в цитоплазме, а второй за счет доставки РК в ядро и стимуляции PPAR α -индуцированных анти-апоптотических генов, а CRABP2 играют опухоль-супрессорную роль в канцерогенезе за счет доставки РК в ядро и запуска RAR-индуцированных про-апоптотических генов [125].

На клетках рака молочной железы обнаружено Мус-зависимое подавление транскрипции гена *CRABP2*, стимулирующее резистентность клеток к РК [43].

1.6.3 Изменение метаболизма РК

К другим потенциальным механизмам, регулирующим внутриклеточную активность РК и участвующим в формировании резистентности, можно отнести изменения системы метаболизма РК. Основными компонентами данной системы являются представители семейства P450, цитохромы CYP26A1 и CYP26B1, которые в наибольшей степени ответственны за окисление РК (прежде всего ATRA) до менее активных полярных метаболитов. При этом некоторые другие цитохромы данного семейства, в частности, CYP3A4 и CYP2C8, также способны участвовать в катаболизме отдельных форм РК, включая 13-цис-РК и ATRA [152]. Согласно одной из имеющихся гипотез, усиление катаболизма РК может быть одним из факторов, способствующих формированию устойчивости. Надо сказать, что прямой проверки данной гипотезы, то есть изучения связи активности цитохромов с чувствительностью клеток к РК, практически не проводилось. Однако с учетом такой возможности, были предприняты попытки аддитивного фармацевтического подавления CYP26 с целью усиления эффективности

терапии на основе АТРА. В качестве таких терапевтических агентов тестировалась группа соединений, называемых «retinoic acid metabolism-blocking agents (RAMBAs)», то есть блокирующих метаболизм РК [59, 152]. Такой подход, к сожалению, не показал высокой эффективности в контексте преодоления РК-резистентности, что может быть обусловлено с одной стороны, большим разнообразием и частичной взаимозаменяемостью цитохромов, с разной степенью активности способных катаболизировать различные изомеры РК. С другой стороны, сложностью ретиноевой сигнализации, включающей множество петель обратной связи, с помощью которых осуществляется транскрипционная регуляция РК-зависимых генов, к которым принадлежат и сами цитохромы группы CYP26.

На модели клеточной линии гепатомы НераRG показано, что при подавлении экспрессии RAR α или RXRa уровень мРНК CYP26A1 значительно снижается [220]. Однако авторы данной работы не оценивали влияние данного ингибирования ни на рост, ни на РК-резистентность клеток.

Другим возможным механизмом РК-резистентности клеток является снижение активности фермента ALDH и, как следствие, уменьшение ее внутриклеточной концентрации. Интересно, что многие исследования в этой области говорят и об обратном процессе влиянии ретиноевой кислоты на активность ALDH1. Так, показано, что АТРА действительно способна снижать экспрессию ALDH1, например при раке легкого (A549) [241], раке толстой кишки (HT29, SW480) [137], и в других опухолевых клетках [144]. В данных опухолях активность ALDH1 повышена и связана с агрессивностью опухоли и лекарственной устойчивостью. Авторы говорят о том, что АТРА подавляет пролиферацию, миграционную активность и повышает чувствительность перечисленных опухолевых клеток к химиотерапии. При этом показано, что АТРА не влияет на уровень мРНК ALDH-1A, но, по-видимому, оказывает ингибирующее действие на пост-трансляционном уровне. Возможным механизмом ограничения активности и снижения экспрессии ALDH1 может являться РК-опосредованная протеолитическая деградация, которая показана для белков p11 [89] и cyclin D1 [118].

1.6.4 Гипотеза связи неканонической активности РК с РК-чувствительностью клеток

В связи с РК-индуцированной активацией белков ключевых сигнальных путей (АКТ, ERK, p38MAPK) неканоническая активность ретиноевой кислоты наряду со вкладом в опухолевую прогрессию может являться одним из механизмов устойчивости к РК и другим ретиноидам. Действительно, помимо описанного ранее участия негеномной активности РК в процессах пролиферации, миграции и реализации канонической транскрипционной активности, в литературе имеются данные о взаимосвязи данного процесса с РК-резистентностью.

В нескольких работах повышение уровня фосфорилированных форм киназ AKT и ERK спустя минуты после обработки АТРА было показано для клеток рака легкого, устойчивых к действию данного ретиноида. Предполагается, что подобная активация белков, играющих ключевую роль в выживании и уходе от апоптоза, может лежать в основе РК-резистентности клеток [82, 178].

Одним из подтверждений роли РК-зависимой нетранскрипционной активации киназы p38MAPK в поддержании РК-чувствительности клеток и реализации транскрипционной активности РК стали результаты, полученные на клетках РМЖ. Так, оказалось, что в отличие от РК-чувствительных линий, в устойчивых к действию РК линиях клеток MDA-MB-453, MDA-MB-361 и BT474 активирующее фосфорилирование данной киназы под действием неканонической активности РК практически не наблюдалось. Также отсутствовало взаимодействие RAR α с белком G α q на липидных рафтах плазматической мембраны [173]. Другим подтверждением стало наличие данного эффекта в РК-чувствительных клетках MCF-7 и клетках острого промиелоцитарного лейкоза, свидетельствующее о важности активации киназы p38MAPK для поддержания РК-чувствительности [10].

Несмотря на вышеперечисленные данные, неканоническая активность ретиноевой кислоты открыта относительно недавно, и в мировой литературе имеется довольно мало работ по этой теме. А связь данного процесса с РК-резистентностью описана косвенно в единичных работах с использованием относительно малого количества клеточных линий. Фактически прямого подтверждения четкой взаимосвязи между процессами неканонической активности и устойчивостью к ретиноидам показано не было.

1.7 Рак молочной железы и РК-чувствительность (Выбор модели)

В литературе имеется множество исследований, посвященных анализу возможного использования АТРА и других ретиноидов для терапии злокачественных новообразований различного происхождения. Однако почти все работы свидетельствуют о том, что многие нозологические формы злокачественных опухолей либо в целом устойчивы, как например, рак яичника, рак легкого [19, 170], глиома [190], либо чувствительны, как нейробластома [184].

В случае РМЖ ситуация с РК-чувствительностью несколько иная. Прежде всего, данный тип опухолей характеризуется крайне высокой морфологической и молекулярно-генетической гетерогенностью. Соответственно, клеточные линии РМЖ также имеют различное гистологическое происхождение и различаются по молекулярным маркерам, способности к пролиферации, миграционной способности и морфологии. Это в целом создает определенные трудности в изучении опухолей данного типа. Однако возможно, что именно вследствие такой

гетерогенности уровень чувствительности клеток РМЖ к РК также сильно варьирует, что объясняет высокий интерес к этому типу злокачественных новообразований в аспекте исследования механизмов активности РК и формирования РК-резистентности. Как видно из представленных выше данных, большинство исследований механизмов РК-резистентности проведены на моделях РМЖ. Недавние исследования показали, что клеточные линии РМЖ включают как РК-чувствительные, так и РК-резистентные клетки [36], причем анализируя данные, полученные в разных исследованиях, можно предположить, что диапазон РК-чувствительности клеток РМЖ может быть очень широким. С учетом сказанного выше линии клеток РМЖ представляются наиболее удобной экспериментальной моделью для изучения механизмов формирования резистентности к ретиноевой кислоте.

По распространенности и по частоте случаев РМЖ занимает второе место после рака легких в большинстве регионов (15% от всех случаев онкологических заболеваний) и является наиболее распространенной причиной смерти от онкологических заболеваний у женщин. У женщин, имеющих мутации в генах BRCA1 и BRCA2 (breast cancer type 1,2 susceptibility protein), риск развития РМЖ составляет до 80% [75].

Традиционные системы классификации РМЖ основаны на таких характеристиках, как размер опухоли, состояние регионарных лимфатических узлов, гистологический тип и морфология опухоли, возраст пациента, а также молекулярные маркеры опухоли.

Молекулярные маркеры используются для диагностики заболеваний на ранних стадиях, а также для определения стратегии терапии. Современная классификация РМЖ базируется на различиях происхождения клеток–предшественников опухоли (базальный/люминальный эпителий). Вторым критерием для классификации РМЖ считается экспрессия в опухоли рецепторов эстрогена (ER) и HER2. Таким образом, выделяют три основных подтипа РМЖ: люминальный (A(ER+, HER2-) и B(ER+, HER2+)), HER2-позитивный и трижды негативный (TN). Все подтипы характеризуются разным течением заболевания, факторами риска, и, соответственно, прогнозом. В клинической практике при диагностике и терапии каждого подтипа РМЖ учитываются эти различия.

Показано, что для клеточных линий, полученных от пациенток с РМЖ, классификация по молекулярным характеристикам остается актуальной, клеточные линии можно применять в качестве экспериментальных модельных систем [187].

Молекулярно-генетическая гетерогенность РМЖ может быть одной из причин отмеченного широкого диапазона РК-чувствительности клеток. Это подтверждается данными о различном эффекте одних и тех же потенциальных факторов, вовлеченных в формирование РК-резистентности, на клетки РМЖ с различным статусом рецепторов [74].

1.8 Заключение

Несмотря на многообразие предложенных гипотетических механизмов формирования РК-резистентности, этот вопрос до сих пор остается открытым. Надо сказать, что большинство работ, исследующих те или иные гипотетические механизмы, проводилось с использованием либо устойчивых, либо чувствительных к действию РК клеток злокачественных опухолей. По отдельным гипотезам формирования РК-резистентности в литературе имеются лишь единичные работы с использованием нескольких линий, включая РК-чувствительные и РК-устойчивые. Кроме того, немаловажно, что во всех исследованиях уровень РК-чувствительности определялся по-разному. Также важно отметить, что среди литературы, посвященной исследованию участия белков CRABP в канцерогенезе, опухолевой прогрессии и РК-резистентности, практически отсутствуют работы, в которых бы проводилось сравнение роли обоих гомологов в исследуемых характеристиках. То же можно сказать и об исследовании ядерных рецепторов РК - в подавляющем большинстве работ они исследовались по отдельности. Поэтому для нас было важно подобрать экспериментальную модель, которая была бы представлена рядом клеточных линий единого происхождения, но варьирующих в широком диапазоне РК-чувствительности, и провести параллельное комплексное исследование различных гипотетических механизмов, определяющих чувствительность/устойчивость клеток к РК для выявления потенциальных факторов, участвующих в формировании РК-резистентности.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Клеточные линии и условия культивации

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. Большая часть работы была выполнена с использованием клеточных линий рака молочной железы (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 псевдовиральных частиц использовались производные линии эмбриональных клеток почки человека HEK-293: клетки GP-293 («Clonotech», США) использовали для получения ретровирусных частиц и последующего проведения гиперэкспрессии в целевых опухолевых клетках, 293FT («Invitrogen», США) – для получения лентивирусных частиц и подавления эндогенной экспрессии генов.

Все клеточные линии культивировали в CO₂-инкубаторе при +37°C, 5% CO₂. В качестве среды для культивирования большинства клеток использовали среду RPMI или DMEM (в зависимости от клеточной линии), содержащую 0,294 мг/мл L-глутамина, 10% эмбриональной бычьей сыворотки («РАА Laboratories», Германия), 0,1 мг/мл стрептомицина, 100 ед/мл пенициллина. Клетки MCF10A эпителия молочной железы культивировали в среде DMEM/F-12 (1 к 1) (ПанЭко», Россия), содержащей 5% сыворотки крови лошади («ПанЭко», Россия), 20 нг/мл ростового фактора EGF («Thermo Fisher Scientific», США), 0,5 мг/мл гидрокортизона («ПанЭко», Россия), 100 нг/мл холерного токсина («Sigma-Aldrich», США) и 10 мкг/мл инсулина («Sigma-Aldrich», США).

2.2 Выделение плазмидной ДНК

Компетентные клетки E.coli, трансформированные плазмидой, высевали на 100-мм бактериальные чашки, содержащие LB-агар (1%) и ампициллин (50 мкг/мл), инкубировали 24 ч в термостате при +37°C. После этого скалывали 1 колонию, переносили в 15 мл среды LB с ампициллином (50 мкг/мл) и инкубировали в течение 16 ч при +37°C при интенсивном перемешивании (220 об/мин) в шейкере-инкубаторе Environmental Shaker («Biosan», Латвия). Затем среду LB, содержащую бактерии, центрифугировали в течение 10 мин при 1700g.

Выделение плазмидной ДНК проводили с помощью коммерческого набора Plasmid Miniprep («Евроген», Россия). К осадку клеток добавляли 250 мкл «Ресуспендирующего раствора» и тщательно ресуспендировали пипетированием. Затем добавляли 250 мкл «Лизирующего раствора», осторожно перемешивали не более 1 мин до тех пор, пока лизат не стал прозрачным. После этого добавляли 350 мкл «Нейтрализирующего раствора», перемешивали переворачиванием до образования творожистой смеси, после чего центрифугировали в течение 10 мин при 13200g для отделения осадка, содержащего белки и геномную ДНК. Надосадочную жидкость (800 мкл) переносили в пробирки со спин-колонками, в которые заранее добавляли 20 мкл «Раствора для удаления эндотоксинов» для улучшения связывания ДНК с носителем. Колонку центрифугировали 30 сек при 7000g и удаляли фильтрат. После этого для улучшения качества плазмидной ДНК для последующей трансфекции в колонку добавляли 200 мкл «Раствора для удаления эндотоксинов», центрифугировали 30 сек при 7000g и удаляли фильтрат. Затем колонку промывали добавлением 700 мкл «Промывочного раствора» и центрифугировали дважды для полного удаления раствора. Колонки переносили в чистые пробирки и добавляли 50 мкл «Элюирующего раствора», инкубировали 1 мин и центрифугировали 1 мин при 7000g для сбора очищенной плазмидной ДНК. Концентрацию выделенной ДНК определяли на спектрофотометре NanoDrop® ND-1000 («NanoDrop Technologies Inc.», США). Проверку наличия вставок в плаزمидах осуществляли с помощью рестрикционного анализа, ПЦР *in situ*, а также секвенированием по Сэнгеру.

2.3 Трансформация компетентных клеток *E. coli*

Аликвоту компетентных клеток *E. coli* размораживали во льду, отбирали 100 мкл в новую пробирку, аккуратно добавляли в нее 50 нг плазмидной ДНК и инкубировали 30 мин на льду (адсорбция плазмиды на клеточной стенке бактерий). После этого проводили тепловой шок – инкубировали клетки при +42°C в течение 1,5 мин (частичное разрушение клеточной стенки и проникновение плазмиды внутрь бактерии). Затем клетки снова инкубировали на льду в течение 5 мин (заживление клеточной стенки). После этого добавляли 900 мкл среды LB без антибиотика и инкубировали клетки при +37°C в течение 60 мин. Клетки осаждали центрифугированием при 3000 g в течение 10 мин. После этого клетки ресуспендировали в 100 мкл LB и рассаживали на 100-мм бактериальные чашки Петри с LB-агаром (1%), содержащим ампициллин (50 мкг/мл).

2.4 Трансфекция

Клетки-паковщики GP-293 высаживали на 60-мм культуральные чашки до достижения ими 70-80% конfluence на следующий день. Спустя 24 ч проводили трансфекцию. Для этого использовали либо ретровирусный вектор pLXSN («Clontech», США) («пустой» в качестве контроля либо содержащий кодирующую последовательность целевого гена) и плазмиду pVSVG («Clontech», США), кодирующую белок оболочки вируса везикулярного стоматита, необходимый для сборки вируса и увеличения тропности вирусных частиц к эукариотическим клеткам. Указанные плазмиды смешивали в эквимолярном количестве (суммарно 2 мкг), после чего добавляли к ним трансфекционный реагент Lipofectamine 2000 Reagent («Invitrogen», США), либо Polyfect («Qiagen», Германия), согласно протоколу производителей. Полученную смесь инкубировали в течение 15 минут и аккуратно приливали к клеткам GP-293. Клеточную среду, содержащую псевдоретровирусные частицы, собирали каждые 24 часа в течение 3 сут, после чего центрифугировали 10 мин при 1500g для удаления клеточного дебриса, супернатант аликвотили и замораживали при -20°C.

Для экзогенной экспрессии (гиперэкспрессии) кодирующие последовательности генов *CRABP1* и *CRABP2* были клонированы в ретровирусный вектор pLXSN («Clontech», США) по сайтам рестрикции XhoI и BamHI (cgs *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). Проверку осуществляли методами рестрикционного анализа полученных конструктов, секвенированием по Сэнгеру, ПЦР с использованием следующих праймеров: pLXSN F: 5' CCCTTGAACCTCCTCGTTCG 3' и pLXSN R: 5' TTTCCACACCTGGTTGCTGA 3', подобранных к участкам вектора, фланкирующим вставку.

Для получения псевдолентивирусных частиц методика в целом была аналогичной за некоторыми исключениями. В качестве паковщиков использовали клеточную линию 293FT. Для данного типа трансфекции брали лентивирусный вектор pLKO.1-puro («Addgene», США), «пустой» в качестве контроля либо содержащий последовательности предшественников малых шпилечных РНК, pVSVG и паковую плазмиду pCMV delta R8.2 («Addgene», США), кодирующую лентивирусные белки. В остальном процедура не отличалась от описанной выше.

Для подавления эндогенной экспрессии *CRABP1* и *CRABP2* использовали последовательности предшественников малых шпилечных РНК, которые были клонированы в плазмиду pLKO.1-puro. Последовательности использованных олигонуклеотидов приведены в таблице 1.

Таблица 1 - Список использованных олигонуклеотидов

sh1CRABP2 F	CCGGGAAATGGGAGAGTGAGAATAACTCGAGTTATTCTCACTCTCCCATT CTTTTTG
sh1CRABP2 R	AATTCAAAAAGAAATGGGAGAGTGAGAATAACTCGAGTTATTCTCACTCT CCCATTTC
sh2CRABP2 F	CCGGCGAGGAATTGCTCAAAGTGCTCTCGAGAGCACTTTGAGCAATTCCTC GTTTTTG
sh2CRABP2 R	AATTCAAAAACGAGGAATTGCTCAAAGTGCTCTCGAGAGCACTTTGAGCA ATTCCTCG
sh10CRABP 1 F	CCGGGCTGGCCAACGATGAACTTATCTCGAGATAAGTTCATCGTTGGCCAG CTTTTTG
sh10CRABP 1 R	AATTCAAAAAGCTGGCCAACGATGAACTTATCTCGAGATAAGTTCATCGTT GGCCAGC
sh14CRABP 1 F	CCGGCGGACGCAAGTGCAGGAGTTTCTCGAGAAACTCCTG CACTTGCGTCCGTTTTTG
sh14CRABP 1 R	AATTCAAAAAGCGGACGCAAGTGCAGGAGTTTCTCGAGAAACTCCTG CACTTGCGTCCG

2.5 Инфекция псевдовиральными частицами

Целевые клетки (клеточные линии опухолей человека) высаживали на 30-мм культуральные чашки до достижения ими 20-30% конfluenceности на следующий день. Спустя 24 ч проводили инфекцию. Аликвоту среды, содержащей вирусные частицы, смешивали со свежей средой, содержащей 10% сыворотки, в соотношении 1 к 1, и приливали к целевым клеткам. Данную процедуру проводили каждые 24 ч в течение 3 сут. Затем целевые клетки инкубировали со свежей средой без вирусов в течение 24 ч, после чего проводили селекцию на антибиотике. Для контроля селекции также рассеивали неинфицированные клетки. В случае ретровирусной инфекции отбор проводили в течение 7-10 дней на антибиотике генитицине (G418, «Sigma», США) в концентрации 500-1500 мкг/мл в зависимости от клеточной линии, среду с антибиотиком меняли каждые 3 дня. В случае лентивирусной инфекции отбор проводили в течение 5 сут на антибиотике пурамицине («Sigma», США) в концентрации 0.5-2 мкг/мл в зависимости от клеточной линии. После отбора на антибиотике целевые клетки наращивали до состояния 80-90% конfluenceности, замораживали при -70°C в среде для заморозки, состоящей из эмбриональной сыворотки с добавлением ДМСО до конечной

концентрации 10%. Для дальнейших экспериментов использовали свежеразмороженные аликвоты полученных клеточных линий.

2.6 Приготовление клеточных лизатов

Клетки высаживали на 60-мм культуральные чашки до достижения 80% конфлюентности. Промывали 1 мл раствора Трипсин-Версена (0.05% Трипсин-ЭДТА и раствор Версена в соотношении 1 к 1) для удаления остатков сывороточных белков, затем снимали в 1 мл раствора Трипсин-Версена, добавляли 3 мл среды с 10% FBS, центрифугировали 6 мин при 1500g и удаляли супернатант. К осадку клеток добавляли 100 мкл лизирующего буфера RIPA (50 mM Tris base, 150 mM NaCl, 0.5% DOX, 0.1% SDS, 1% NP-40, 2 mM EDTA), с добавлением ингибиторов протеаз («Roche», Швейцария) и фосфатаз («Thermo Scientific», США). Лизис проводили в течение 30 мин при температуре 4°C при постоянном перемешивании, после чего лизаты центрифугировали 10 мин при 13200 g. Супернатант аликвотили и хранили при -80°C.

2.7 Иммуноблоттинг

На первом этапе определяли концентрацию белка в лизатах по методу Бредфорда. 1 мкл лизата растворяли в 200 мкл готового буфера, содержащего 5x Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate («BioRad», США), детекцию проводили при длине волны 595 нм на спектрофотометре Benchmark Plus («BioRad», США). Для приготовления проб 15 мкг белка смешивали с 4x буфером для нанесения на гель (краска, содержащая бромфеноловый синий, SDS, меркаптоэтанол и глицерин), доводили объем пробы до 20 мкл лизирующим буфером RIPA, кипятили при 95°C в течение 5 мин в термоблоке T3-Termocycler («Biometra», США) и охлаждали до 4°C. После этого пробы подвергали кратковременному центрифугированию, перемешивали пипетированием и аккуратно вносили по 20 мкл в каждую лунку. Разделение белков проводили в 10%-17%-SDS-полиакриламидном геле в трис-глициновом буфере (Tris base, глицин, SDS). Белки переносили методом мокрого переноса на PVDF мембрану («Millipore», Германия) в буфере для переноса (Tris base, глицин, этиловый спирт) при 100 В и 250 мА в течение 1 ч в приборе Mini Trans-Blot («Bio-Rad Laboratories GmbH», США). Качество переноса проверяли окраской мембраны красителем Ponceau S («Sigma», США). После этого мембрану инкубировали в блокирующем растворе (5% обезжиренное молоко («BioRad», США) или 5% BSA («PAA Laboratoties GmbH», США), 0,1% TWEEN-20 («MP Biomedicals, LLC») в TBS) в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем мембрану инкубировали в течение 15 ч с первичными антителами при +4°C при постоянном аккуратном покачивании, отмывали 3 раза

по 5, 10 и 15 мин соответственно в TBS, содержащем 0,1% TWEEN-20, при комнатной температуре. После этого мембрану 1-1,5 ч инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, при комнатной температуре. После стандартной отмывки (3 раза по 5, 10 и 15 мин) мембрану проявляли с помощью реагента для хемилюминесцентной реакции ECL (Enhanced Chemoluminescence; «Millipore», Германия). Хемилюминесцентную реакцию регистрировали на приборе Kodak GelLogic 2200 Imaging system с последующей обработкой с помощью программы Kodak Molecular Imaging Software SE ver. 5.0.1.27. Список использованных первичных и вторичных антител приведен в таблице 2.

Таблица 2 - Список использованных в работе антител

№	Название	Производитель, кат. номер	Разведение
1	Anti-rabbit козы поликлональные антитела, конъюгированные пероксидазой хрена	Cell Signalling, 29902	1:65000
2	Anti-mouse козы поликлональные антитела, конъюгированные пероксидазой хрена	Abcam, ab5887	1:10000
3	Anti-beta-actin кроличьи поликлональные антитела	Abcam, ab8227	1:5000
4	Anti-CRABP1 кроличьи поликлональные антитела	Sigma, HPA017203	1:1000
5	Anti-CRABP2 кроличьи моноклональные антитела	Sigma, HPA004135	1:500
6	Anti-pAKT (S473) кроличьи моноклональные антитела	Cell Signalling, 4060S	1:1000
7	Anti-pERK-1/2 (T202/Y204) мышьиные моноклональные антитела	Cell Signalling, 9106S	1:1000

2.8 Исследование клеточных характеристик *in vitro*. Анализ динамики роста клеток

Клетки сажали по 25-300 тыс на 30-мм культуральные чашки в 3-х повторах для каждой временной точки и культивировали в стандартных условиях. Для анализа скорости роста из

двух чашек ежедневно снимали клетки в 1 мл раствора Версена и 0.05% Трипсин-ЭДТА (в соотношении 1:1). Затем из полученной смеси брали 10 мкл, смешивали с трипановым синим в соотношении 1:1, вносили в камеру Горяева и подсчитывали количество клеток. Данную процедуру повторяли в течение 5-ти дней. Затем проводили анализ полученных значений с использованием программ Excel и GraphPad Prism. Количество клеток в лунке рассчитывали с использованием формулы: $X/4 \cdot 10^4$ (где X-количество клеток в 100 больших квадратах). На основании полученных данных строили кривые роста.

В отдельных экспериментах для оценки влияния РК на пролиферацию по прошествии 5 дней высчитывали разницу между количеством живых клеток в чашках без АТРА и при инкубации с АТРА. Клетки в количестве 25-300 тыс (в зависимости от клеточной линии) высевали на 30-мм культуральные чашки, через 5 дней проводили анализ количества клеток с помощью прямого подсчета в камере Горяева и на автоматическом счетчике TC10 Automated Cell Counter («BioRad», США). Все эксперименты были выполнены в 3-х технических и в более чем 3-х биологических повторах.

2.9 Обработка клеток АТРА

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 в 60-мм культуральные чашки по 800 тыс. клеток на чашку. Спустя 24 ч среду заменяли на бессывороточную на 18 ч (голодание). После этого меняли среду на DMEM/RPMI, содержащую 10% FBS, с добавлением АТРА в концентрации 1 мкМ для клеток нейробластомы и 5 мкМ для НМРЛ) и инкубировали 5, 15, 30, 60, 240 минут, одну чашку оставляли без инкубации в качестве «контроля». По прошествии указанного времени клетки снимали с подложки и лизировали по вышеописанной методике для дальнейшего анализа белков методом иммуноблоттинга.

2. Исследование влияния экспрессии CRABP1/2 на устойчивость клеток к АТРА. Клетки сажали в 35 мм чашки в количестве 25-300 тыс. на чашку в зависимости от клеточной линии (для достижения 80% монослоя на момент подсчета клеток). На следующий день клетки обрабатывали 0.1, 1, 10 мкМ АТРА – для чувствительных к действию РК линий, для РК-устойчивых клеток использовали 10, 50 и 100 мкМ АТРА. В качестве контроля использовали клетки, обработанные ДМСО (в количестве, соответствующему максимальной концентрации АТРА для каждой группы клеток): 0.1% для чувствительных и 1% для устойчивых. Через 5

дней проводили анализ количества клеток с помощью прямого подсчета в камере Горяева. Эксперименты проводили в 3-х технических и в 3-х и более биологических повторах.

3. Исследование влияния АТРА на экспрессию мРНК и белков ретиноевого сигналинга. Клетки сажали в 60 мм чашки в количестве 50-600 тыс. на чашку в зависимости от клеточной линии. На следующий день все клетки обрабатывали 0.1, 1, 10 мкМ АТРА – для исследования экспрессии белков. Для анализа изменения экспрессии мРНК клетки обрабатывали 1 мкМ АТРА. Спустя 3 дня инкубации клетки лизировали для выделения белка и РНК для последующего анализа с помощью иммуноблоттинга и ОТ-ПЦР.

4. Исследование влияния АТРА на продукцию CYP26A1 и CYP26B1. Клетки высевали в количестве 50-300 тысяч в зависимости от клеточной линии и культивировали в течение 5-ти сут в присутствии 0.01-100 мкМ АТРА. Клетки снимали в 1 мл раствора Версена и 0.05% Трипсин-ЭДТА (в соотношении 1:1), смешивали с красителем «трипановый синий» 1:1 и подсчитывали с помощью камеры Горяева или на автоматическом счетчике TC10 Automated Cell Counter. В качестве контроля для каждой линии использовали клетки, культивируемые параллельно в течение того же времени в среде без АТРА, содержащей ДМСО, в концентрации, соответствующей максимальной концентрации АТРА для каждой линии. Количество живых клеток в контроле в каждом независимом повторе для каждой линии брали за 100%. Оценку РК-чувствительности проводили более чем в трех повторах для каждого из измерений, соответствующих каждой концентрации АТРА.

Анализ изменения уровня экспрессии генов проводили после обработки клеток 1мкМ АТРА – концентрации, при которой АТРА оказывала минимальный эффект на пролиферацию клеток (средняя концентрация начала снижения пролиферации РК-чувствительных клеток). Клетки инкубировали с АТРА в течение 3-х суток.

2.10 Проточная цитофлуориметрия

Оценку влияния АТРА на клеточный цикл проводили методом проточной цитофлуориметрии. Клетки сажали на 35 мм чашки по 20 тыс. (для MCF7, HCC1954 и MDA-MB-231) и по 70 тыс. (для SKBR3) на чашку. На следующий день клетки обрабатывали АТРА в концентрации 0.1-10 мкМ и инкубировали в течение 72, 96 и 120 часов. Затем клетки снимали с подложки раствором трипсина-ЭДТА, дважды отмывали центрифугированием в холодном PBS с добавлением 0.2% FBS (400 g, 4°C, 5 мин). Далее клетки фиксировали 70%-ным этиловым спиртом, минимум 60 мин при 4°C. Фиксированные клетки отмывали от спирта центрифугированием (400 g, 4°C, 10 мин), промывали PBS и осаждали (400 g, 4°C, 5 мин), осадок ресуспендировали в PI-буфере (0.1% Тритон-X100, 0.5 ед/мл РНКазы А, 50мг/мл

пропидий йодид (PI) в PBS). Полученные образцы анализировали на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto™ II flow cytometer, измерение флуоресценции образцов производилось в каналах PE-A и PerCP-A. Затем строились гистограммы распределения клеток в зависимости от интенсивности флуоресценции определяли: пик, соответствующий G1-фазе клеточного цикла, пик, соответствующий большему значению флуоресценции, а значит и большему количеству ДНК, – G2/M-фазы, между двумя пиками – область, соответствующая S-фазе. Клетки, имеющие больше ДНК, чем в G2/M, причисляли к полиплоидным, а меньше, чем в G1-фазе, – subG1 (с фрагментированными ядрами), к погибшим.

Для определения количества апоптотических клеток использовали метод прижизненного окрашивания Аннексином V в комбинации с PI. Метод позволяет различать популяции клеток: живых (Annexin-PI-), находящихся на ранних стадиях апоптоза (Annexin+PI-), на поздних стадиях апоптоза и некротических (Annexin+PI+) клеток. Подсчёт количества погибших клеток производился с помощью набора eBioscience Annexin V Apoptosis Detection Kit APC («Thermo Fisher Scientific», США). Клетки центрифугировали, отбирали супернатант, инкубировали с PI как по описанной выше методике, промывали и инкубировали в 1x аннексин-связывающем буфере с добавлением аннексина V, конъюгированного с флуоресцентной меткой, 15 мин в темноте. Затем отмывали и ресуспендировали клетки в 1x аннексин-связывающем буфере, после чего измеряли флуоресценцию в каналах PE и APC на проточном цитофлуориметре.

2.11 Выделение тотальной РНК

Клетки рассаживали на 60-мм или 100-мм культуральные чашки (в зависимости от клеточной линии) в таком количестве, чтобы спустя 24 ч они образовали субконфлюентный монослой. На следующий день клетки снимали с чашек в 1 мл раствора Версена и 0.05% Трипсин-ЭДТА (в соотношении 1:1), осаждали центрифугированием в течение 6 минут при 2000 g, удаляли супернатант. РНК выделяли с помощью коммерческого набора для выделения суммарной РНК и микроРНК из реагента «Лира». Осадок клеток лизировали в 1 мл реагента «Лира» в течение 10 мин, центрифугировали 10 мин при 10000 g для осаждения ДНК. Супернатант отбирали в чистую пробирку и добавляли к нему 200 мкл хлороформа, инкубировали 5 минут, периодически перемешивая, центрифугировали 10 мин при 10000 g при 4°C. После этого аккуратно отбирали верхнюю (водную) фазу, содержащую РНК, добавляли к ней равный объем 95% этанола, перемешивали и наносили на колонку, центрифугировали 30 с при 10000 g, удаляли фильтрат. Затем дважды промывали колонку 500 мкл буфера для промывки WB (содержащим этанол), центрифугировали в таких же условиях, удаляли фильтрат. Центрифугировали пустую пробирку для удаления остатков буфера WB 3 мин при

10000 g., переносили колонку в новую чистую пробирку. На центр фильтра колонки аккуратно наносили 60 мкл буфера для элюции EB, инкубировали 1 мин при комнатной температуре, центрифугировали 1 мин при 10000 g. Концентрацию полученной РНК а также ее чистоту от примесей оценивали с помощью прибора NanoDrop® ND-1000 («NanoDrop Technologies Inc.», США). Очистку РНК от примесей ДНК проводили с помощью фермента DNase I, Amplification Grade («Invitrogen», США). К 2000 нг РНК добавляли 1 ед ДНКазы и инкубировали 15 минут при 25°C, фермент инактивировали добавлением 1мкл 25 mM EDTA при 65°C в течение 10 минут. Очищенную РНК использовали для ОТ-ПЦР-РВ.

2.12 Обратная транскрипция и ПЦР в реальном времени

Для получения кДНК использовали 2000 нг тотальной РНК и проводили реакцию обратной транскрипции с использованием MMLV-ревертазы (в конечной концентрации 5ед/мкл), случайного дека-нуклеотидного праймера (20 мкМ) («Евроген», Россия). Реакцию проводили при 37°C в течение 50 минут. Концентрацию кДНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop® ND-1000, в реакцию ПЦР брали 100 нг кДНК на лунку. К 100 нг кДНК добавляли по 500 нМ смеси специфических праймеров (Таблица 3), реакционную смесь для ПЦР-РВ с флуоресцентным красителем SYBR-green (5X qPCRmix-HS) («Евроген», Россия) и проводили амплификацию в режиме: 95°C, 15 сек; 57°C, 15 сек; 72°C, 30 сек - 42 цикла. Относительный уровень базальной экспрессии мРНК различных генов и изменение экспрессии мРНК *CYP26A1*, *CYP26B1* после обработки АТРА вычисляли методом $\Delta\Delta Ct$.

Относительный уровень экспрессии (Fold) = $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$. $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (экспериментальной группы) – ΔCt (контрольной группы). $\Delta Ct = Ct$ гена интереса – Ct референсного гена. Ct (Пороговое число циклов) – это число циклов ПЦР, при котором флуоресценция превышает пороговое значение.

В каждом случае нормализацию проводили по количеству ПЦР-продукта гена *RPL27* (референсный ген).

Таблица 3 - Последовательности использованных праймеров для проведения реакции ПЦР в реальном времени

Ген	Последовательность
<i>RPL27</i>	Forward: ACCGCTACCCCGCAAAGTG Reverse: CCCGTCGGGCCTTGCGTTTA
<i>RARα</i>	Forward: GGACATTGACCTCTGGGACA Reverse: AAGGTCATGGTGTCCCTGCTC
<i>RARβ</i>	Forward: GGACCTTGAGGAACCGACAA Reverse: ATGCTAGGACTGTGCTCTGC Zond: AGACGACCCAGCAAGCCTCACATGT
<i>CYP26A1</i>	Forward: CCAGAAAGTGCGAGAAGAGC Reverse: GTCTTCAGAGCAACCCGAAA
<i>CYP26B1</i>	Forward: GCTGCATGATGAGTGAGGTG Reverse: CAGGGCAAGGACTACTTGG A
<i>CRABP1 pr.5</i>	Forward: CTCAAGGCACTGGGTGTGAAC Reverse: TGTAGAACTGATCCCCGTCC
<i>CRABP1 pr.Art</i>	Forward: TTGCGAGCTCAGAGTGTGC Reverse: ATTGTCATGGGGAAAACGGG
<i>CRABP2</i>	Forward: GGAGCTTCTGCTCACAGACC Reverse: GCCAGCAGTGGAGATCAAAC

2.13 Оценка влияния ингибиторов ДНК-метилтрансферазы и HDAC на экспрессию генов

Деметилирование ДНК проводили с использованием децитабина (5-Aza-2'-deoxycytidine - DAC) («Sigma-Aldrich», США) – специфического ингибитора ДНК-метилтрансферазы, для оценки значения деацетилирования гистонов использовали трихостатин А (TSA) («Sigma-Aldrich», США) – ингибитор гистондеацетилазы (HDAC). Клетки РМЖ рассаживали на 60 мм чашки в количестве 150-800 тыс в зависимости от клеточной линии, на следующий день добавляли 0.5-10 мкМ DAC и инкубировали 72 часа. Каждые 24 часа меняли половину среды на содержащую двукратное количество DAC, таким образом поддерживая конечную концентрацию вещества. Клетки MDA-MB-231 и HBL100 обрабатывали DAC (по вышеописанной методике), TSA (48 часов культивировали на обычной среде, а затем обрабатывали 100 нМ TSA в течение 24 часов), а также исследовали сочетанное воздействие обоих соединений, для чего клетки инкубировали с 5 мкМ DAC в течение 48 часов, а затем с

100 нМ TSA в течение 24 часов. В контрольные клетки каждые 24 часа добавляли ДМСО в концентрации, соответствующей максимальной концентрации DAC или TSA. После инкубации клетки лизировали по описанным ранее методикам для получения РНК и белка, анализ экспрессии CRABP1 проводили методами ОТ-ПЦР и иммуноблоттинга.

2.14 Выделение ДНК из клеток

Выделение ДНК проводили с помощью коммерческого набора «ExtractDNA Blood & Cells» («Евроген», Россия) по следующей процедуре. Клетки после инкубации промывали 1 мл раствора Версена, снимали в 1 мл раствора Версена и 0.05% Трипсин-ЭДТА (в соотношении 1:1), осаждали центрифугированием в течение 6 минут при 2000 g. Клетки суспендировали в 100 мкл PBS смешивали со 110 мкл лизирующего раствора с протеинкиназой К, добавляли 10 мкл «Суспензии GAUSS» (Grinding Advanced Ultra Simple System), перемешивали на вортексе и инкубировали 10 минут при 56°C при периодическом перемешивании. После этого в пробирки добавляли 100 мкл 96% этилового спирта, 400 мкл «Связывающего раствора М», перемешивали на вортексе, центрифугировали 1 мин при 11000 g. Супернатант отбирали в колонки, центрифугировали в том же режиме, 4 раза промывали добавлением 700 мкл «Промывочного раствора», каждый раз центрифугируя после этого. Затем оставляли пробирки открытыми на 5 мин при комнатной температуре для удаления следовых количеств спирта, после чего добавляли 100 мкл «Элюирующего раствора» в центр мембраны и инкубировали 5 минут. Для сбора раствора, содержащего ДНК, проводили финальное центрифугирование в том же режиме. Концентрацию ДНК в элюате определяли с помощью NanoDrop® ND-1000 («NanoDrop Technologies Inc.», США).

2.15 Бисульфитное секвенирование

Для оценки уровня метилирования ДНК проводили бисульфитное секвенирование, состоящее из бисульфитной конверсии и пиросеквенирования.

Бисульфитную конверсию выделенной геномной ДНК проводили с помощью коммерческого набора EZ DNA Methylation™ Kit (Zymo Research, The Epigenetics Company) по протоколу производителя.

Данный метод заключается в том, что бисульфит действует на одноцепочечную ДНК, превращая цитозин в урацил. Если этот цитозин метилирован, то есть к его пятому атому углерода присоединена метильная группа, то такой цитозин не подвергается превращению. Таким образом, бисульфит изменяет последовательность ДНК в зависимости от её уровня

метилирования, и после его воздействия можно установить, какие CpG-динуклеотиды были метилированы, сравнив измененную последовательность с исходной.

Далее проводили пиросеквенирование - метод, позволяющий анализировать метилирование множества CpG динуклеотидов в составе одного ампликона в реальном времени. Для прочтения последовательности ампликона используется подход секвенирования через синтез.

На первом этапе нужные участки гена *CRABP1* с помощью специфических биотинилированных праймеров (Таблица 4) амплифицировали методом ПЦР. Далее для получения одноцепочечной ДНК в качестве матрицы для пиросеквенирования мы проводили пробоподготовку на вакуумной станции PyroMark Q24 («QIAGEN», США). Для этого ампликоны, полученные после ПЦР, конъюгировали с сефарозой покрытой стрептавидином в связывающем буфере в течении 10 минут, активно перемешивая. После инкубации немедленно собирали ампликоны, конъюгированные с сефарозой при помощи станции вакуумной пробоподготовки. Следующим шагом ампликоны отмывали от солей и остаточной ДНК 70% этанолом. В буфере для денатурации от биотинилированных ампликонов отмывали комплементарные им ампликоны, синтезированные с небитинилированных праймеров. И наконец, оставшуюся на сефарозе одноцепочечную матрицу очищали промывочным буфером и смешивали ее с 25 мкл 0,3 мкМ секвенирующих праймеров, разведенных в буфере для отжига. Отжиг праймеров осуществляли инкубацией смеси на 90°C в течение 2 мин и постепенном ее остужении в течение 5 мин. Пиросеквенирование проводили на приборе PyroMark Q24 («QIAGEN», США). Полученные в результате секвенирования последовательности анализировали при помощи программного обеспечения PyroMark Q24 Advanced Software, позволяющего проводить анализ уровня метилирования сайтов CpG или CpN. Изменение уровня метилирования в клетках РМЖ рассчитывали, как разность между процентом метилирования ДНК в клетках после обработки ДАС и контрольными клетками.

Таблица 4 - Список использованных праймеров

Название	Последовательность
Biot-CRABP1_F1:	biot-TTGAGGTATAATTGGGTTGGG
CRABP1_R1:	RGCAARGAACACACTCTAAACT
CRABP1_F:	GGAGGTTGAGGTATAATTGGGTT
Biot-CRABP1_R:	Biot-TARGRGCCTTAAATCACTAAAA
CRABP1_S:	GAGGTATAATTGGGTTGGGAGTTGA

2.16 Статистическая обработка результатов

Для сравнения пролиферации двух групп клеток (количества живых клеток после 5 дней культивирования в среде DMEM/RPMI, содержащей 10% FBS) использовали t-критерий Стьюдента. Для оценки уровня РК-чувствительности клеток после 5 дней инкубации с АТРА использовали 2-х факторный дисперсионный анализ ANOVA. Для сравнения относительного уровня экспрессии мРНК различных генов в двух клеточных линиях использовали t-критерий Стьюдента. Для сравнения относительного уровня экспрессии мРНК в группах клеток по РК-резистентности использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. Для расчета коэффициента корреляции продукции белков использовали критерий корреляции Спирмена. Методы статистического анализа исходного уровня экспрессии генов, а также изменения уровня экспрессии *CYP26A1* и *CYP26B1* включали использование двухвыборочного критерия Стьюдента для зависимых и независимых выборок, критерия Манна-Уитни, анализ дисперсии (ANOVA) для сравнения нескольких групп (с посттестом Даннетта). При анализе связи *RAR α* с РК-чувствительностью применяли вариант ANOVA с проведением линейного анализа трендов (значимости изменений переменной в ряду РК-чувствительности клеток).

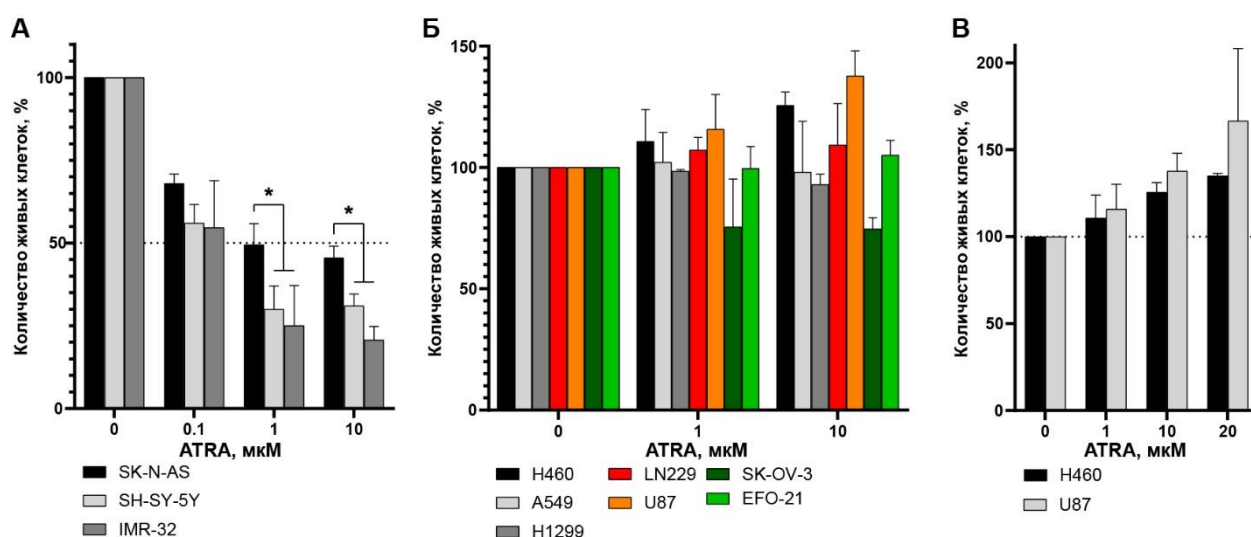
Статистически значимыми считали значения $p < 0.05$ (на рисунках обозначены как «*»), либо $p < 0.01$ (на рисунках обозначены как «**»). Все данные были получены в результате трех независимых экспериментов. Данные представлены в виде среднего \pm стандартного отклонения (SD). Для расчетов и построения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

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

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

3.1.1 Сравнение чувствительности к ретиноевой кислоте опухолевых клеток различного происхождения

Для оценки РК-чувствительности были использованы линии злокачественных опухолей различного происхождения: глиобластомы (LN229, U87), нейробластомы (SK-N-AS, SH-SY-5Y, IMR32), рака легкого (H460, A549, H1299), рака яичника (OVCAR-3, OVCAR-4, OVCAR-8, EFO-21, SK-OV-3). Клетки обрабатывали АТРА в концентрации 0.1-100 мкМ в течение 120 часов. Затем анализировали количество живых клеток. Клетки всех линий нейробластомы, а именно, SK-N-AS, SH-SY-5Y, IMR-32, продемонстрировали высокую чувствительность к АТРА. Количество живых клеток этих линий значительно снижалось при обработке АТРА в концентрации 0.1 мкМ, а при 1 мкМ и 10 мкМ количество живых клеток было 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. При этом клетки SK-N-AS оказались достоверно менее чувствительны к АТРА ($p < 0.05$) по сравнению с линиями SH-SY-5Y и IMR-32 (Рисунок 10). Клетки линий рака легкого, глиобластомы и рака яичника оказались устойчивыми к действию АТРА – при обработке 1 мкМ и 10 мкМ количество живых клеток не снижалось, а в некоторых случаях даже увеличивалось (H460 и U87).



А – Клетки нейробластомы показали подавление пролиферации (то есть сокращение числа живых клеток на 50% и более) при инкубации с АТРА в концентрациях 1 и 10 мкМ по сравнению с контрольной группой. **Б** - Пролiferация клеток НМРЛ, глиобластомы и рака яичника при инкубации с АТРА в тех же концентрациях не снижалась до 50%-го порога. **В** - Клетки H460 и U87 продемонстрировали увеличение количества клеток при концентрации АТРА 1, 10 и 20 мкМ. Диаграммы построены на основании средних значений для трех независимых повторов эксперимента

Представлена процентная доля живых клеток спустя 5 дней инкубации в присутствии различных концентраций АТРА по сравнению с контрольной группой. Контроль: за 100% взято количество живых клеток каждой линии после культивирования в течение того же времени в стандартной среде DMEM с добавлением ДМСО в концентрации, соответствующей максимальной концентрации АТРА

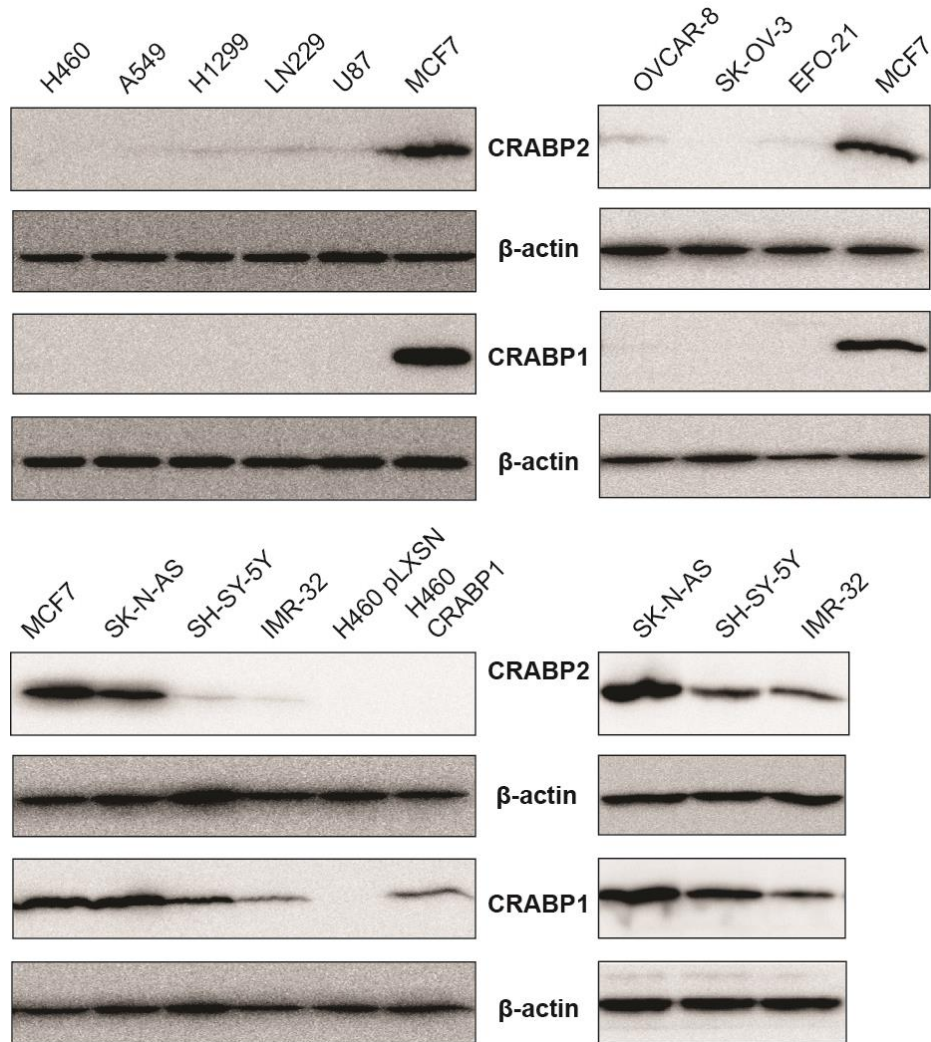
Рисунок 10 - Сравнение динамики пролиферации опухолевых клеток различного происхождения при инкубации с АТРА.

3.1.2 Экспрессия CRABP в РК-чувствительных и РК-резистентных клетках опухолей различного происхождения

Основываясь на литературных данных о возможном участии белка CRABP1 в негативной регуляции активности РК и ограничении ее биодоступности, мы высказали предположение, что CRABP1 может быть задействован в развитии резистентности опухолевых клеток к РК. Для проверки возможной связи данного белка с РК-чувствительностью мы провели сравнительный анализ экспрессии CRABP1 в чувствительных и устойчивых к РК линиях клеток.

Результаты исследования показали, что во всех клетках немелкоклеточного рака легкого (линии A549, H1299 и H460), рака яичника (линии SK-OV-3, OVCAR-8 и EFO-21) и

глиобластомы (линии LN229 и U87) продукция белка CRABP1 отсутствовала. В то же время клетки нейробластомы (линии SK-N-AS, SH-SY5Y и IMR-32) характеризовались высокой продукцией данного белка (Рисунок 11).



В качестве положительного контроля экспрессии использована линия РМЖ MCF7. В качестве контроля специфичности антител в отношении белков CRABP1 и CRABP2 использованы производные сублинии H460 с гиперэкспрессией CRABP1 (H460 CRABP1) и экспрессией вектора без вставки (H460 pLXSN). Результаты по линиям нейробластомы приведены в нижней части рисунка дважды – совместно с клетками MCF7 (слева) и в отсутствие MCF7 (справа) во избежание нивелирования («маскировки») различий в экспрессии белков CRABP1 и CRABP2 между линиями при той же экспозиции мембраны в присутствии сильного сигнала от MCF7

Рисунок 11 - Сравнение продукции белков CRABP1 и CRABP2 методом иммуноблоттинга в линиях опухолевых клеток различного происхождения: НМРЛ (H1299, A549, H460), рака яичника (OVCAR-8, SK-OV-3, EFO-21), глиобластомы (LN229, U87), нейробластомы (IMR32, SK-N-AS, SH-SY-5Y)

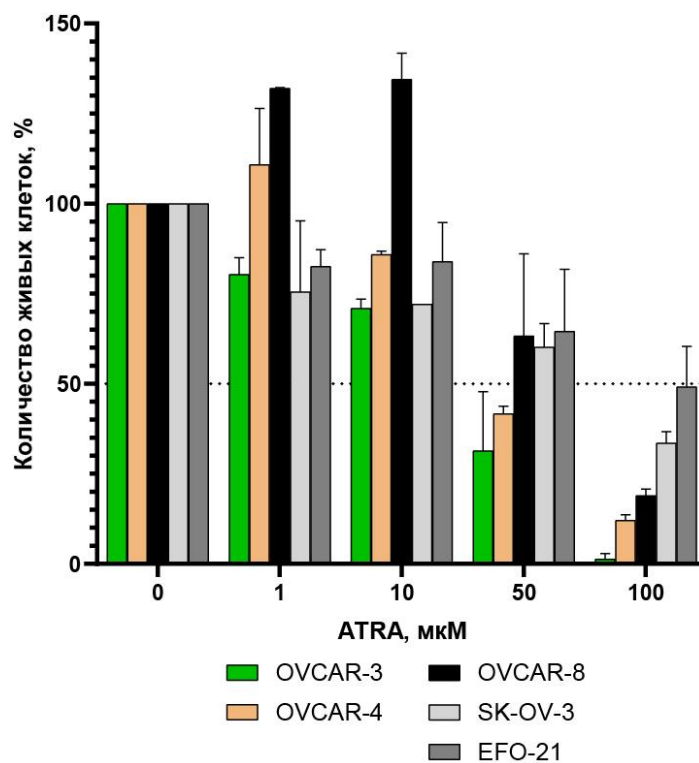
Поскольку в целом ряде анализируемых клеточных линий наблюдалось полное отсутствие белка CRABP1, мы включили в исследование линию РМЖ MCF7 (данные анализа экспрессии CRABP1 в клетках РМЖ будут представлены ниже), в которой по литературным данным оба гомолога CRABP продуцируются на высоком уровне [125, 169]. Результаты анализа показали, что клетки всех нозологических типов опухолей, в которых детектировалась продукция CRABP1, характеризовались высокой экспрессией белка CRABP2, а клетки, в которых белок CRABP1 не регистрировался, - значительным снижением или отсутствием CRABP2. Отсутствие возможной кроссреактивности используемых антител была подтверждена с помощью анализа продукции обоих гомологов в клетках с экзогенной экспрессией CRABP1 (Рисунок 11). Для этой задачи провели сравнение производных клеток H460, характеризующихся исходным отсутствием продукции CRABP1, - сублиний H460 CRABP1 (с гиперэкспрессией CRABP1) и H460 pLXSN (контроль). Специфичность антител подтверждалась отсутствием детекции CRABP2 при гиперэкспрессии CRABP1.

Согласно литературным данным, глиобластомы, немелкоклеточный рак легкого и рак яичника относятся в целом к РК-резистентным нозологиям, то время как нейробластомы считаются чувствительными к РК, что соответствует и полученным нами результатам сравнения РК-чувствительности клеток данных нозологических типов опухолей. Таким образом, подтверждалось наше предположение о связи экспрессии CRABP1 с чувствительностью клеток к РК, поскольку этот белок экспрессировался в нейробластомах и не детектировался в линиях рака легкого, глиобластомы и рака яичника. Экспрессия белка CRABP2 также отличалась – в нейробластомах он детектировался на высоком уровне, а в линиях НМРЛ, глиобластомы и рака яичника продукция CRABP2 была значительно ниже, либо отсутствовала. В этой связи мы предположили наличие взаимосвязи между экспрессией двух гомологов и существование регуляторной связи между белками CRABP1 и CRABP2. Однако обе гипотезы (о связи CRABP1 с РК-чувствительностью и о корреляции экспрессии гомологов CRABP1 и CRABP2) нуждались в подтверждении. Для одновременной проверки обоих предположений желательно было использовать экспериментальную модель, представленную линиями клеток одного нозологического типа, но с варьирующим в широком диапазоне уровнем РК-чувствительности.

3.1.3 Исследование связи чувствительности к ретиноевой кислоте с экспрессией CRABP1 в клетках рака яичника

Для проверки обеих гипотез на первом этапе мы решили сравнить чувствительность к РК различных клеточных линий рака яичника, так как по данным иммуноблоттинга в некоторых из них может обнаруживаться CRABP1, в то время как в клетках рака легкого и

глиобластомы экспрессия данного белка достоверно не детектировалась. Рак яичника считается в целом скорее РК-резистентным типом опухолей, однако степень этой резистентности могла быть разной. Для анализа уровня РК-резистентности была использована панель линий рака яичника, включая OVCAR-3, OVCAR-4, OVCAR-8, SK-OV-3 и EFO-21, которые инкубировали с ATRA в концентрациях 1, 10, 50, и 100 мкМ. Согласно результатам анализа, обработка 1 и 10 мкМ ATRA приводила к незначительному снижению пролиферации, значимый эффект - снижение числа живых клеток до 50% и более ($p < 0.05$) - отмечалось лишь при обработке клеток 50 и 100 мкМ ATRA (Рисунок 12). Таким образом, наши данные подтвердили, что все исследованные линии рака яичников характеризуются РК-резистентностью.



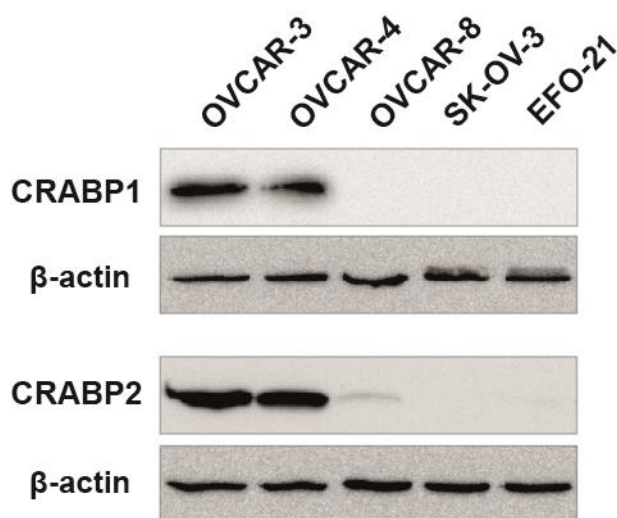
Приведен процент живых клеток после инкубирования с ATRA в различных концентрациях в течение 120 часов по сравнению с контролем. Контроль: за 100% взято количество живых клеток каждой линии после культивирования в течение того же времени в стандартной среде DMEM с добавлением ДМСО в концентрации, соответствующей максимальной концентрации ATRA

Рисунок 12 - Сравнение динамики пролиферации опухолевых клеток рака яичника при инкубации с ATRA

При этом клетки OVCAR-3 и OVCAR-4 оказались менее устойчивы к действию высоких концентраций РК по сравнению с клетками OVCAR-8, SK-OV-3 и EFO-21 - высокие дозы

АТРА привели к значимому снижению их пролиферации более чем на 50%. Интересно отметить эффект стимуляции пролиферации клеток OVCAR-8 под воздействием небольших концентраций АТРА (1 и 10 мкМ). Напомним, что сходный эффект был ранее обнаружен на линиях H460 (HMPJ) и U87 (глиобластома).

Далее мы исследовали экспрессию CRABP1 и CRABP2 в этих клеточных линиях. Методом иммуноблоттинга продукция CRABP1 детектировалась в менее устойчивых клетках OVCAR-3 и OVCAR-4 и отсутствовала - в наиболее РК-резистентных. Экспрессия CRABP2 в клетках OVCAR-3 и OVCAR-4 также была значительно выше, чем в OVCAR-8, SK-OV-3 и EFO-21 (Рисунок 13). Стоит также отметить, что CRABP1 экспрессируется только в клеточных линиях с высокой продукцией CRABP2, OVCAR-3 и OVCAR-4.



В более чувствительных к РК клетках OVCAR-3 и OVCAR-4 наблюдается высокая экспрессия CRABP1 и CRABP2. В более РК-резистентных OVCAR-8, SK-OV-3 и EFO-21 экспрессия CRABP1 отсутствует, продукция CRABP2 либо очень низкая, либо не детектируется

Рисунок 13 - Сравнение уровня экспрессии белков CRABP1 и CRABP2 в клетках рака яичника

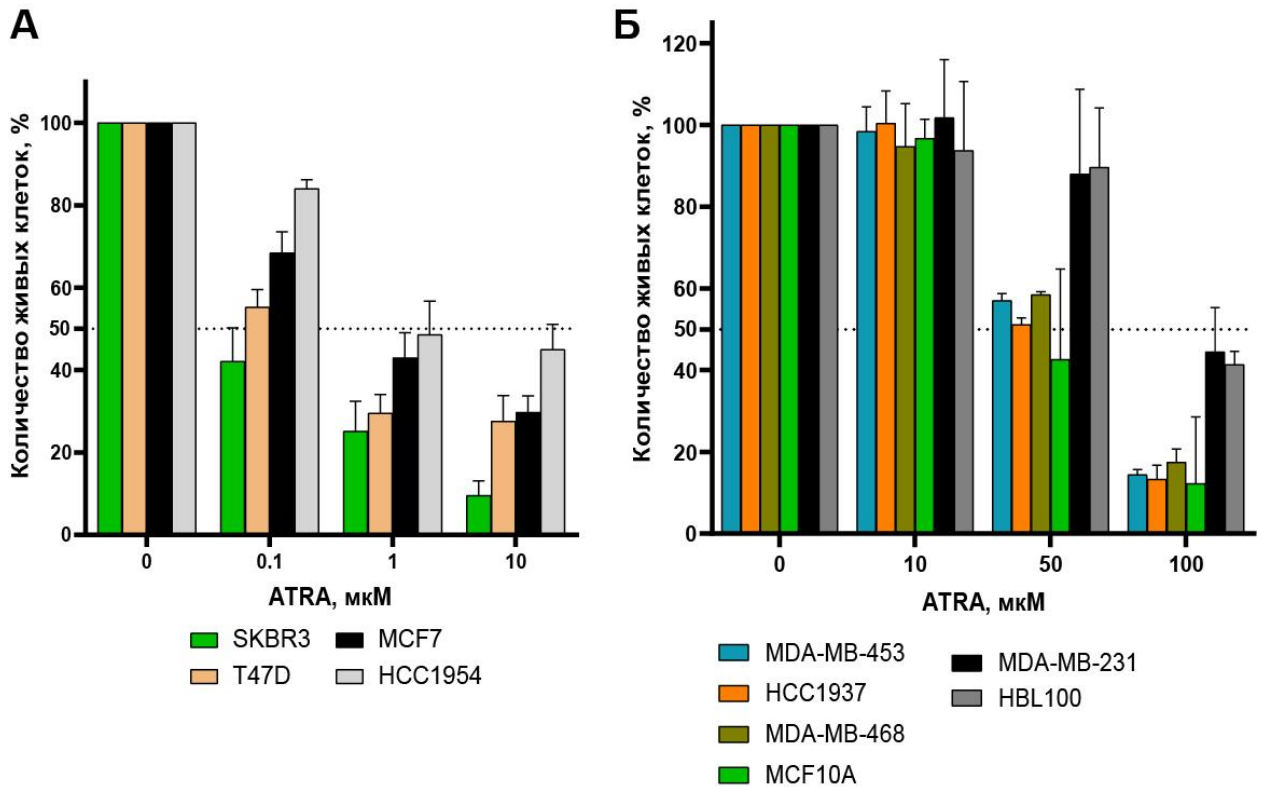
Таким образом, сравнение клеточных линий в рамках одного РК-резистентного типа опухолей подтверждают обе гипотезы - о связи CRABP1 с РК-чувствительностью и о корреляции продукции белков CRABP1 и CRABP2.

Однако для того, чтобы исследовать связь белков CRABP с РК-резистентностью более детально, нам необходимо было выбрать модель, которая включала бы клеточные линии одного происхождения с максимально широким спектром вариативности по РК-чувствительности/резистентности.

3.1.4 Сравнение чувствительности к ретиноевой кислоте клеток рака молочной железы

Для проверки обеих приведенных выше гипотез мы использовали экспериментальную модель, представленную линиями клеток РМЖ. Выбор модели был обусловлен в первую очередь обширным пулом преклинических данных о высоком потенциале РК в отношении воздействия на клетки РМЖ [52, 80, 255]. Также немаловажное значение имеет крайне высокая гетерогенность РМЖ как по клинико-морфологическим характеристикам, так и по молекулярно-биологическим признакам, среди которых гормональный статус (рецепторы эстрогена и прогестерона), а также экспрессия HER2/neu. Наконец, имеющиеся данные литературные данные свидетельствуют о большой вариативности данного типа опухолей по уровню чувствительности к РК [20, 36].

Необходимо отметить, что для анализа чувствительности к РК в разных исследованиях использовались как различные методы, так и концентрации РК. В этой связи для более детального исследования связи продукции белков CRABP с РК-чувствительностью важно было провести сравнительный анализ и выбрать критерии оценки РК-чувствительности с использованием широкой панели клеток в одинаковых условиях. Для этой задачи было выбрано 9 линий клеток РМЖ, а также линия условно нормальных клеток эпителия молочной железы MCF10A. Для выбора порогового значения РК и разделения на группы по РК-чувствительности использовали АТРА в диапазоне концентраций 0,05-100 мкМ. По результатам титрования АТРА и анализа количества живых клеток были выбраны пороговые концентрации АТРА и критерии, позволяющие разделить линии клеток на РК-чувствительные и РК-резистентные. Линии клеток, демонстрировавшие снижение пролиферации в 2 раза и более при обработке АТРА в концентрации менее 10 мкМ, были отнесены к чувствительным. Этому критерию соответствовали клетки SKBR3, T47D, MCF7 и HCC1954 (Рисунок 14А). Эта группа, в свою очередь, разделилась на "максимально чувствительные" (снижение пролиферации более, чем в 2 раза, при 0,1-1 мкМ АТРА), к которым относились SKBR3 и T47D, и "средне чувствительные", пороговое снижение пролиферации которых наблюдалось при инкубации с 1-10 мкМ АТРА. К этой группе относились линии MCF7 и HCC1954. К резистентным были отнесены линии клеток, пролиферации которых не изменялась при инкубации с 10 мкМ АТРА. В группу РК-резистентных вошли линии MDA-MB-453, MDA-MB-468, MDA-MB-231, HCC1937, HBL100, а также MCF10A (Рисунок 14Б).



А – РК-чувствительные линии демонстрировали снижение пролиферации при концентрации полумаксимального ингибирования ATRA до 10мкМ. **Б** – РК-резистентные линии демонстрировали снижение пролиферации при концентрации ATRA от 50 мкМ и выше. Диаграммы построены на основании средних значений для трех независимых повторов эксперимента

Рисунок 14 - Сравнение динамики пролиферации клеток РМЖ при инкубации с ATRA

Более того, пролиферация клеток данной группы значимо не менялась и при их обработке 20 мкМ ATRA. В тоже время эта группа показала значимые различия при использовании 50 мкМ ATRA – пороговое снижение пролиферации или отсутствие значимых изменений. В соответствии с этим критерием были выделены группы «средне-резистентных» клеток, к которым относились линии MDA-MB-453, MDA-MB-468, HCC1937 и MCF10A, и «максимально-резистентных» клеток, в которую вошли линии HBL100 и MDA-MB-231. Интересно, что в группе РК-чувствительных линий оказались клетки, экспрессирующие на высоком уровне рецепторы ER или HER2, в то время как все линии трижды негативного РМЖ характеризовались РК-резистентностью (Таблица 5).

Таблица 5 - Уровень РК-чувствительности линий клеток РМЖ (на основании ранее опубликованных данных [70]). IC₅₀ (концентрация полумаксимального ингибирования) – концентрация АТРА, необходимая для 50% ингибирования роста клеток по сравнению с контролем

РК-чувствительные, ER(+) или HER2(+)		РК-резистентные, трижды негативный статус	
Максимально чувствительные	Средне-чувствительные	Средне-резистентные	Максимально резистентные
SKBR3 (IC ₅₀ =0.05 мкМ), T47D (IC ₅₀ =0.1 мкМ)	MCF7 (IC ₅₀ =0.7 мкМ), HCC1954 (IC ₅₀ =2.9 мкМ)	HCC1937 (IC ₅₀ =50 мкМ), MDA-MB-468 (IC ₅₀ =57 мкМ)	MDA-MB-231 (IC ₅₀ =94 мкМ), HBL100 (IC ₅₀ =93 мкМ)

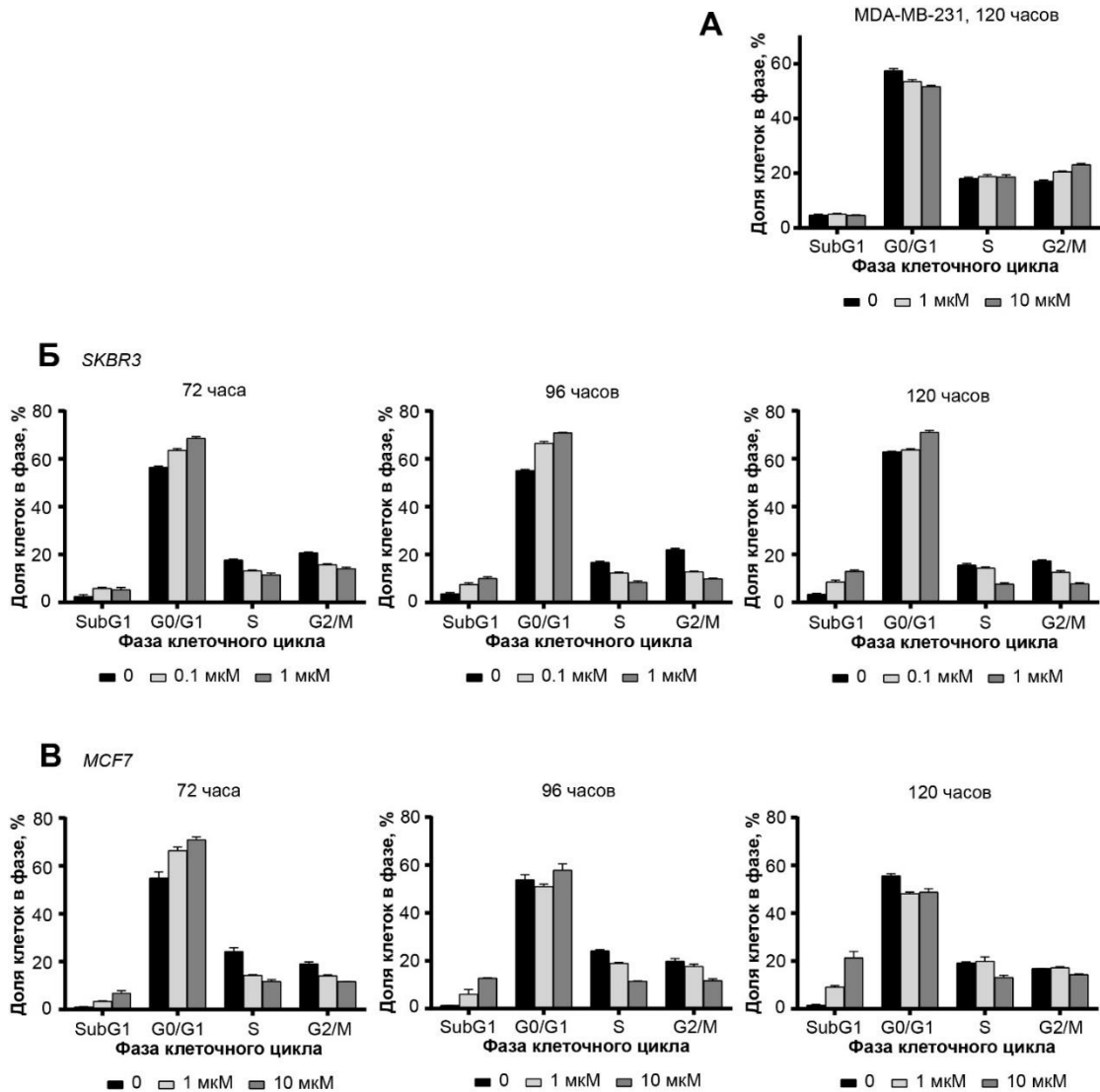
3.1.5 Исследование механизмов рост-ингибирующей активности АТРА в клетках рака молочной железы с разной чувствительностью к ретиноевой кислоте

Для изучения механизма действия РК на клетки РМЖ был проведен анализ клеточного цикла с помощью метода проточной цитофлуориметрии. Для этого клетки с разным уровнем РК-чувствительности, MCF7, SKBR3 и MDA-MB-231, инкубировали в присутствии 0.1-10 мкМ АТРА в течение 120 часов, после чего анализировали процент клеток, находящихся в различных фазах клеточного цикла.

Результаты анализа показали, что в клетках РК-резистентной линии MDA-MB-231 под действием РК имели место лишь незначительные изменения - тенденция к увеличению процента клеток, находящихся в S-фазе, а также увеличение в фазе митоза и снижение в фазе Go/G1. При этом доля клеток в состоянии SubG1 не изменялась (Рисунок 15А). В совокупности это означает, что РК не препятствует, а даже несколько способствует росту клеток MDA-MB-231, что мы и наблюдали при анализе их пролиферации в присутствии соответствующих концентраций АТРА.

В случае SKBR3 мы видим другую ситуацию – увеличение доли клеток в Go/G1, снижение в S-фазе и фазе митоза, а также некоторое увеличение SubG1. То есть наблюдается арест клеточного цикла в фазе Go/G1 (Рисунок 15Б, правая панель). В клетках MCF7 в тех же условиях (120 часов инкубации) ситуация оказалась «промежуточной». С одной стороны, мы наблюдали снижение доли клеток в Go/G1, с другой стороны – количество клеток в S-фазе также несколько снижалось, при этом наиболее выраженным изменением был рост процента клеток в SubG1, что свидетельствует о запуске процессов клеточной гибели (Рисунок 15В,

правая панель). Для того, чтобы прояснить картину, особенно для MCF7, мы проанализировали процесс в динамике при изменении времени инкубации с АТРА. Для этого клетки MCF7 и SKBR3 инкубировали 72 и 96 часов и анализировали клеточный цикл.



А. Изменение фаз клеточного цикла клеток MDA-MB-231 после 120 часов инкубации с АТРА в различных концентрациях. **Б.** Изменение фаз клеточного цикла клеток SKBR3 после 72, 96 и 120 часов инкубации с АТРА в различных концентрациях. **В.** Изменение фаз клеточного цикла клеток MCF7 после 72, 96 и 120 часов инкубации с АТРА в различных концентрациях

Рисунок 15 - Сравнение изменения фаз клеточного цикла в линиях РМЖ при инкубации с АТРА в течение 120 часов. В качестве контроля (обозначена как «0») были использованы клетки, инкубированные с ДМСО в концентрации, соответствующей максимальной концентрации АТРА

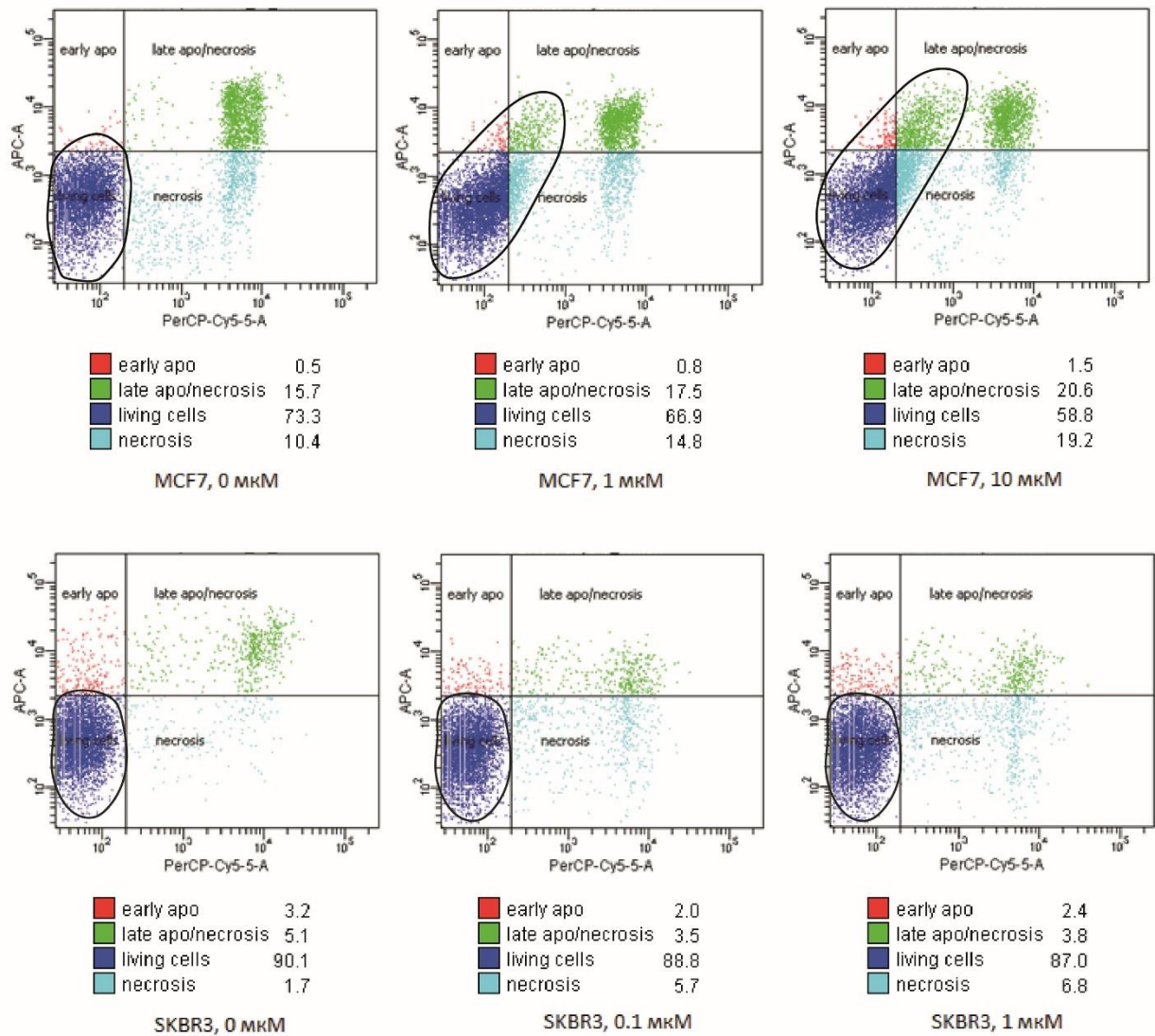
Сравнивая полученные результаты (Рисунок 15) можно заключить следующее. В случае SKBR3 мы, во-первых, видим снижение в S-фазе и фазе митоза. Кроме того, мы наблюдаем эффект увеличения Go/G1, максимально выраженный на 72 и 96 часах инкубации, и этот эффект снижается к 120 часам инкубации. Параллельно мы видим эффект накопления клеток в SubG1, который, наоборот, усиливается с увеличением времени инкубации и максимально выражен при 120 часах инкубации.

В клетках MCF7 вначале (72 часа) мы наблюдаем те же эффекты, что и для SKBR3 - увеличение Go/G1, снижение клеток в S-фазе и фазе митоза. Однако начиная с 96 часов доля клеток в Go/G1 перестает расти, а к 120 часам начинает снижаться. Также при 120 часах инкубации уже не происходит снижения доли клеток в S-фазе и фазе митоза. Вместе с тем, по мере увеличения инкубации мы видим пропорциональное увеличение доли клеток в фазе SubG1.

Таким образом, мы видим, что АТРА не влияет или даже несколько способствует прохождению цикла клетками РК-резистентной линии MDA-MB-231 и препятствует прохождению цикла РК-чувствительными клетками, причем механизм воздействия АТРА может быть разным – арест клеточного цикла в фазе Go/G1 и стимуляция клеточной гибели, причем степень влияния каждого их механизмов на рост клеток и их динамическое соотношение варьируют.

Для того, чтобы понять вклад клеточной гибели в РК-опосредованное снижение динамики пролиферации РК-чувствительных клеток, мы исследовали уровень апоптоза после 96 часов инкубации с АТРА с помощью прижизненного окрашивания клеток аннексином V в комбинации с PI. Результаты показали значимое снижение количества живых клеток MCF7, а также увеличение количества клеток в состоянии позднего апоптоза и некроза (Рисунок 16А), при этом эффект являлся дозозависимым. Данный результат позволяет констатировать, что для клеток MCF7 АТРА-индуцируемый апоптоз является одним из основных механизмов РК-зависимого снижения динамики пролиферации.

Обработка SKBR3 приводит к незначительному снижению количества живых клеток, по-видимому, за счет небольшого увеличения некроза при отсутствии индукции апоптоза (Рисунок 16Б), что согласуется с увеличением количества клеток в субфазе SubG1 по данным анализа клеточного цикла при том же времени экспозиции с АТРА (Рисунок 15Б). Эти эффекты свидетельствуют о задержке прохождения клеточного цикла в Go/G1. Независимо от концентрации АТРА количество живых клеток SKBR3 значительно не снижается, а количество клеток в фазе апоптоза и некроза значимо не повышается. Это означает, что основной вклад в снижение динамики пролиферации клеток SKBR3 вносит описанный выше арест клеточного цикла.



На рисунке основная популяция клеток обведена черным цветом для лучшей визуализации. Обработка клеток MCF7 ATRA приводит к смещению популяции клеток в сторону «позднего апоптоза» и «некроза». Обработка клеток SKBR3 не приводит к изменению количества живых клеток. В качестве контроля (обозначена как «0 мкМ») были использованы клетки, инкубированные с ДМСО в концентрации, соответствующей максимальной концентрации ATRA

Рисунок 16 - Анализ изменения количества клеток РМЖ в состоянии апоптоза и некроза после инкубации с ATRA в различных концентрациях методом окрашивания Аннексином V и PI

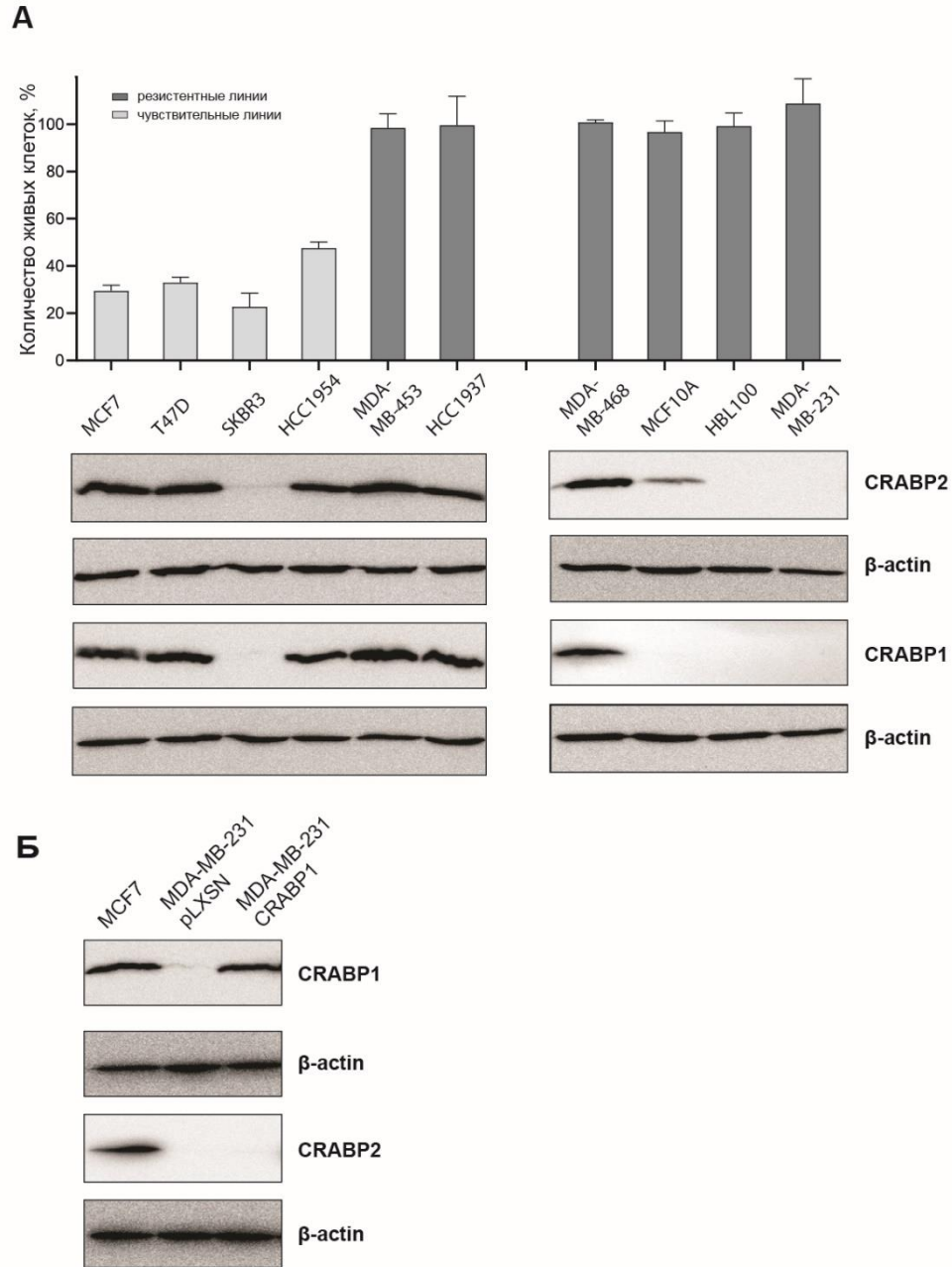
В целом, можно сказать, что на РК-чувствительные клетки ATRA оказывает преимущественно антипролиферативное, а не цитотоксическое действие.

3.1.6 Анализ продукции белков CRABP1 и CRABP2 в клетках рака молочной железы

Описанные выше результаты анализа РК-чувствительности показали, что клетки РМЖ обладают широким спектром ответа на РК (от высокого уровня до практически полного отсутствия чувствительности), и используемая панель линий является хорошей моделью для исследования связи белков CRABP1 и CRABP2 с РК-резистентностью. В рамках этой модели был проведен сравнительный анализ экспрессии обоих гомологов, однако строгой корреляции продукции CRABP1 и РК-чувствительностью обнаружено не было. В частности, экспрессия CRABP1 не детектировалась в одной из РК-чувствительных линий (SKBR3), в то время как некоторые более резистентные клетки - HCC1937, MDA-MB-453 и MDA-MB468 - характеризовались высоким уровнем его экспрессии (Рисунок 17А).

В то же время следует отметить, что в максимально резистентных клетках, MDA-MB-231 и HBL100, экспрессия данного белка отсутствует. Это означает, что в случае РМЖ связь данного белка с РК-чувствительностью либо отсутствует, либо носит более сложный характер, то есть определяется сочетанием различных факторов, среди которых помимо CRABP1 может присутствовать целый ряд молекул ретиноевого сигналинга, а также другие факторы прогрессии РМЖ, например, статус гормональных рецепторов и ряд других. Таким образом, для окончательного ответа на вопрос о связи экспрессии CRABP1 с РК-чувствительностью необходимо провести прямую оценку его влияния на данную характеристику клеток РМЖ.

С другой стороны, результаты сравнения экспрессии белков CRABP1 и CRABP2 подтвердили нашу гипотезу об их взаимосвязи. В частности, как можно видеть на рисунке, все клетки, демонстрирующие выраженную продукцию CRABP2, характеризуются высоким уровнем CRABP1, а в клетках с низким уровнем CRABP2 продукция CRABP1 практически отсутствует. Также отсутствует она и в клетках, где CRABP2 не регистрируется. Анализ корреляции подтвердил достоверную связь между экспрессией двух гомологов - по результатам трех независимых повторов, значение коэффициента корреляции Спирмена: $r=0,8921$, p (two-tailed) <0.0001 .

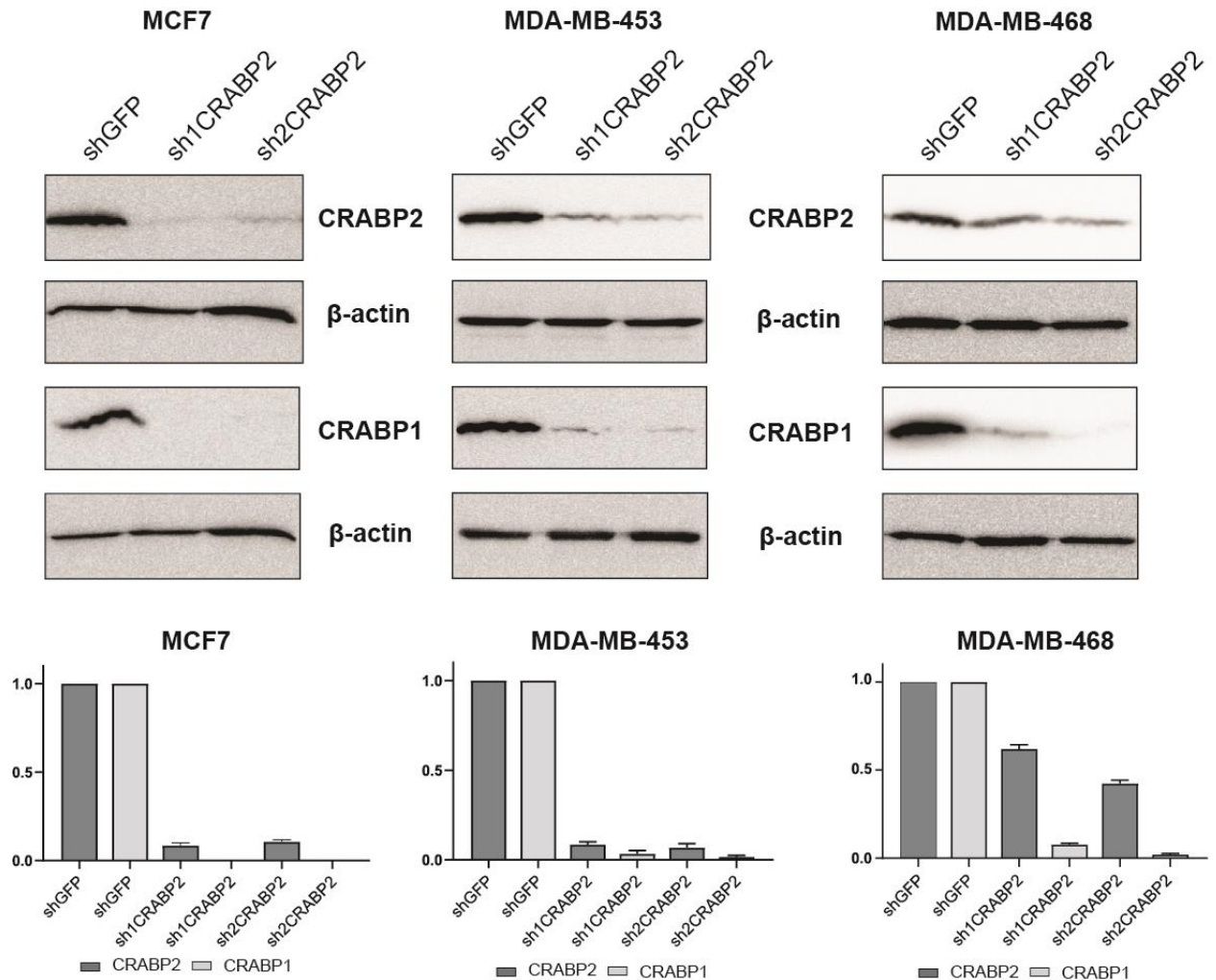


А – Процент живых клеток каждой линии по сравнению с соответствующим контролем (взят за 100%) при инкубации с АТРА в концентрации 10 мкМ и результаты иммуноблоттинга тех же линий; **Б** – Для подтверждения специфичности антител в отношении белков CRABP1 и CRABP2 приведены данные полученных производных сублиний клеток MDA-MB-231 с гиперэкспрессией CRABP1 (MDA-MB-231 CRABP1) и экспрессией вектора без вставки (MDA-MB-231 pLXSN)

Рисунок 17 - Сравнение продукции белков CRABP1 и CRABP2 в линиях РМЖ с различной РК-чувствительностью

Для исключения кросс-реактивности, мы дополнительно проверили специфичность антител. Для этой задачи мы получили сублинию MDA-MB-231 со стабильной экспрессией CRABP1. На рисунке 17Б видно, что гиперэкспрессия CRABP1 в клетках MDA-MB-231 не приводит к изменению уровня CRABP2, что подтверждает селективность используемых антител. Учитывая данные, полученные нами при анализе продукции гомологов CRABP в клетках других нозологических типов опухолей, результаты, полученные на данной модели, подтверждают универсальный характер выявленной взаимосвязи между экспрессией CRABP1 и CRABP2. Такая универсальная корреляция указывает на существование взаиморегуляции между этими белками. Учитывая то, что гиперэкспрессия CRABP1 в обеих производных сублиниях РМЖ (H460 и MDA-MB-231) не повлияла на эндогенную экспрессию CRABP2, а также тот факт, что отсутствие CRABP1 отмечалось в клетках с пониженным уровнем CRABP2, а обратного эффекта, то есть отсутствия CRABP2 при снижении CRABP1, не наблюдалось, мы предположили, что более вероятным является CRABP2-зависимая регуляция CRABP1, а не наоборот.

В целях проверки данной гипотезы мы провели нокдаун CRABP2 в трех клеточных линиях, включая РК-чувствительную MCF7 и РК-резистентные линии MDA-MB-453 и MDA-MB-468. Подавление эндогенной экспрессии осуществляли методом РНК-интерференции с использованием малых шпилечных РНК к гену CRABP2, sh1CRABP2 и sh2CRABP2 (последовательности приведены в разделе «Материалы и методы»), которые были трансдуцированы в клетки-реципиенты в составе генно-инженерной конструкции на основе вектора pLKO.1 риго с помощью лентивирусной инфекции. Полученные после селекции на пурамицине стабильные производные всех трех линий показали высокую эффективность обеих последовательностей shRNA. Так, уровень CRABP2 в клетках, экспрессирующих sh1CRABP2, снизился в 1,6 - 10 раз, а в клетках, экспрессирующих sh2CRABP2 - в 2,5 - 10 раз по сравнению с соответствующими контролями (производные сублинии тех же клеток с экспрессией shGFP) (Рисунок 18). Далее мы провели анализ экспрессии CRABP1 и обнаружили значительное снижение его продукции во всех клетках с нокдауном CRABP2 (Рисунок 18). Полученные результаты подтвердили, что уровень CRABP1 зависит от CRABP2 и может им регулироваться.



Для анализа использованы производные ПК-чувствительной линии MCF7 и ПК-резистентных (MDA-MB-453, MDA-MB-468) линий РМЖ, экспрессирующих последовательности малых шпилечных РНК к мРНК CRABP2 (sh1CRABP2 и sh2CRABP2). В качестве контролей использованы те же линии, экспрессирующие малые шпилечные РНК к зеленому флуоресцентному белку (shGFP). Диаграммы построены на основании данных денситометрического обсчета результатов трех независимых повторов эксперимента

Рисунок 18 - Влияние нокдауна *CRABP2* на продукцию CRABP1 в линиях РМЖ

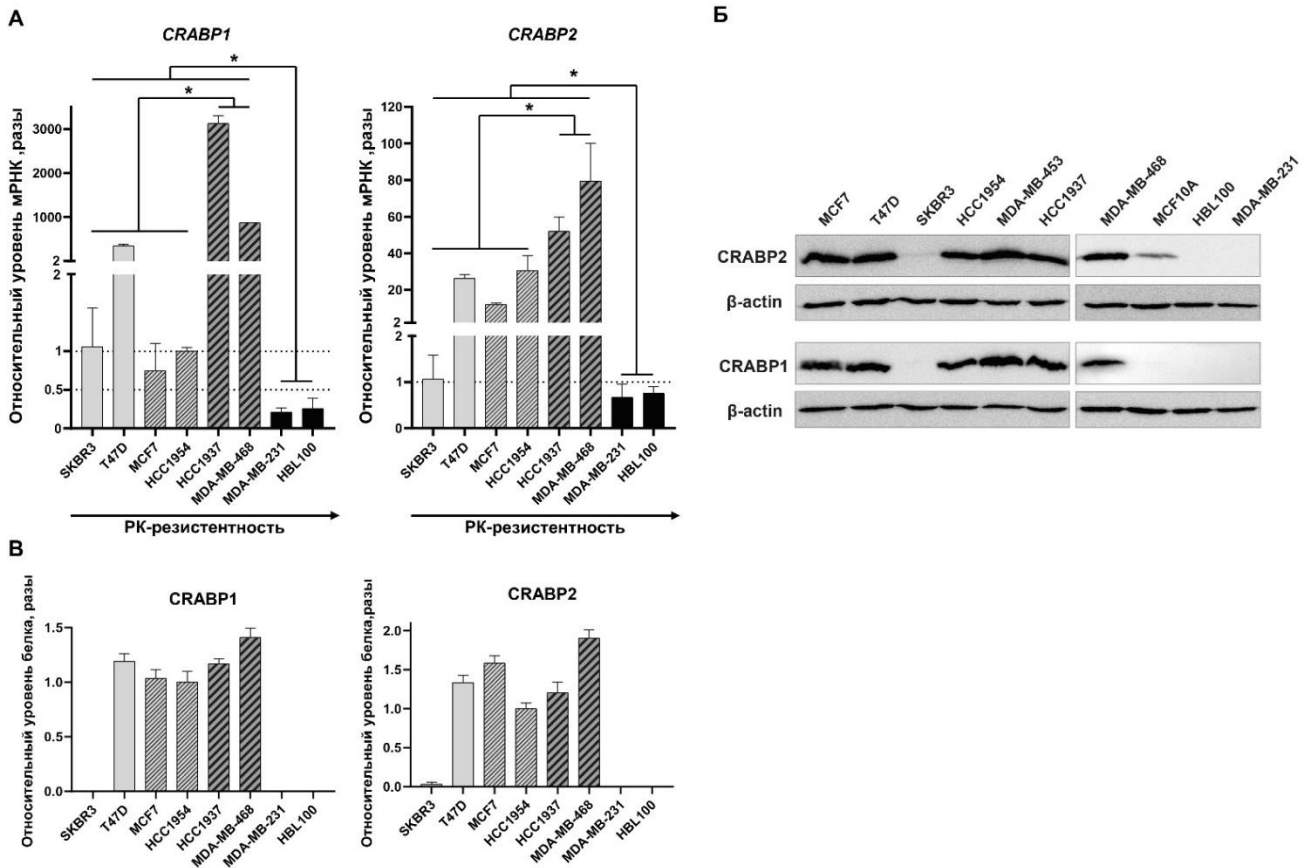
Для того, чтобы понять, на каком уровне, транскрипционном или посттранскрипционном, осуществляется обнаруженная регуляция, мы проанализировали изменения экспрессии мРНК *CRABP1* в клетках MDA-MB-468 с подавленной экспрессией *CRABP2*. Анализ экспрессии *CRABP1* методом ОТ-ПЦР-РВ в производных сублиниях клеток MDA-MB-468 sh1CRABP2 и sh2CRABP2 показал отсутствие значимых изменений уровня мРНК *CRABP1* по сравнению с контролем. Таким образом, *CRABP2*-зависимая регуляция экспрессии *CRABP1*, по-видимому, осуществляется на посттранскрипционном уровне.

Суммируя вышесказанное, нами впервые показана корреляция между экспрессией CRABP1 и CRABP2, а также наличие CRABP2-зависимой регуляции CRABP1. Универсальность обнаруженной регуляторной связи между гомологами CRABP2 и CRABP1 указывает на ее важное функциональное значение и свидетельствует о том, что данный феномен представляет собой новый дополнительный механизм регуляции внутриклеточной активности РК.

3.1.7 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 продукцией белков CRABP и РК-чувствительностью клеток РМЖ, а также в связи с обнаруженной очень сильно выраженной разницей в продукции CRABP1 между исследуемыми линиями, мы попытались понять, чем обусловлена такая разница, а также оценить возможную связь CRABP1 с РК-чувствительностью на уровне экспрессии мРНК.

Для этого из той же панели были выбраны по две линии клеток из каждой группы по РК-чувствительности и проведен сравнительный анализ экспрессии мРНК *CRABP1*. Сравнение проводили методом ОТ-ПЦР РВ, в качестве референсного гена использовали *RPL27*, обсчет проводили методом $\Delta\Delta C_t$. Последовательности праймеров приведены в разделе «Материалы и методы». По результатам анализа в максимально резистентных линиях MDA-MB-231 и HBL100, где отсутствовала продукция белка CRABP1, мРНК *CRABP1* также почти не обнаруживается (Рисунок 19А). В клетках HCC1937 и MDA-MB-468 из группы «средне-резистентных» линий с высоким уровнем белка CRABP1 экспрессия мРНК *CRABP1* регистрировалась на максимальном уровне. Группа РК-чувствительных линий характеризовалась значительно более низкой экспрессией мРНК *CRABP1*. Удивительным результатом было то, что в линиях MCF7 и HCC1954 при достаточно высоком уровне белка CRABP1 мРНК детектировалась на крайне низком уровне (значения C_t составляли 36 циклов и выше). При этом в случае CRABP2 аналогичного эффекта не обнаружено, и уровень мРНК соотносится с уровнем белка. Также интересно, что на уровне мРНК корреляция между CRABP2 и CRABP1 отсутствует.



А. Анализ экспрессии генов *CRABP1* и *CRABP2* методом ОТ-ПЦР РВ. За единицу принимали значение относительного уровня мРНК *CRABP* в линии SKBR3. **Б.** Анализ уровня белков CRABP в тех же линиях: приведены ранее полученные авторами результаты иммуноблоттинга [70]. **В.** Анализ денситометрии экспрессии белков CRABP в исследованных клетках РМЖ

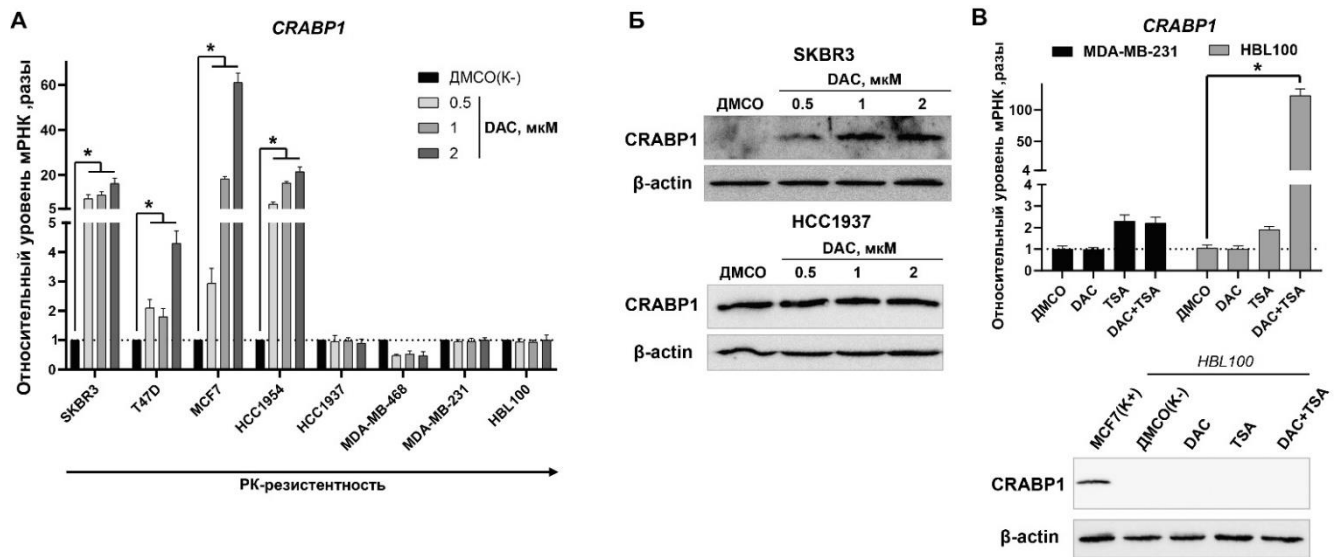
Группы линий с разной РК-чувствительностью (см. Таблица 5) объединены одним типом штриховки. Стрелкой на рисунке А иллюстрировано возрастание уровня РК-резистентности. Статистически значимыми считали значения $p < 0.05$ (на рисунке обозначены как «*»)

Рисунок 19 - Анализ экспрессии CRABP1 и CRABP2 в линиях клеток РМЖ с разным уровнем РК-чувствительности

3.1.8 Анализ влияния деметилирования ДНК и ингибирования деацетилирования гистонов на экспрессию *CRABP1*

Для анализа метилирования гена *CRABP1* в качестве возможной причины снижения экспрессии клетки обрабатывали ингибитором ДНК-метилтрансфераз – 5-aza-deoxycytidine (DAC). Обработка деметилирующим агентом клеток, относящихся к группе РК-чувствительных линий, во всех случаях привела к увеличению уровня мРНК *CRABP1*, причем эффект DAC был

дозозависимым (Рисунок 20А, линии SKBR3, T47D, MCF7, HCC1954). В тех же линиях (включая SKBR3 с отсутствием продукции CRABP1) наблюдалось и увеличение белка (Рисунок 20Б). При этом обработка DAC клеток из группы РК-резистентных линий (HCC1937, MDA-MB-468, MDA-MB-231 и HBL100) не оказала значимого эффекта. Такие результаты свидетельствуют о том, что в максимально резистентных клетках экспрессия CRABP1 репрессируется на более глубоком уровне с помощью других механизмов эпигенетической регуляции.



А. Влияние деметилирования гена *CRABP1* (обработка DAC) на уровень экспрессии мРНК *CRABP1*. **Б.** Влияние деметилирования гена *CRABP1* на продукцию белка CRABP1. Иллюстрации приведены для клеток SKBR3 в качестве примера восстановления экспрессии и для клеток HCC1937- в качестве примера отсутствия эффекта. **В.** Влияние обработки максимально-резистентных клеток MDA-MB-231 и HBL100 агентами DAC, TSA и DAC совместно с TSA на уровень мРНК *CRABP1*.

Результаты анализа продукции белка CRABP1 в клетках HBL100 приведены в качестве примера отсутствия индукции экспрессии. На рисунке А повышение уровня РК-резистентности клеточных линий указано стрелкой. Звездочкой отмечены статистически значимые различия при значении $p < 0.05$. За единицу принимали значение относительного уровня экспрессии CRABP в клетках SKBR3. DAC - 5-Aza-2'-deoxycytidine, TSA – трихостатин А.

Рисунок 20 - Анализ экспрессии CRABP1 в клетках РМЖ после обработки DAC и TSA

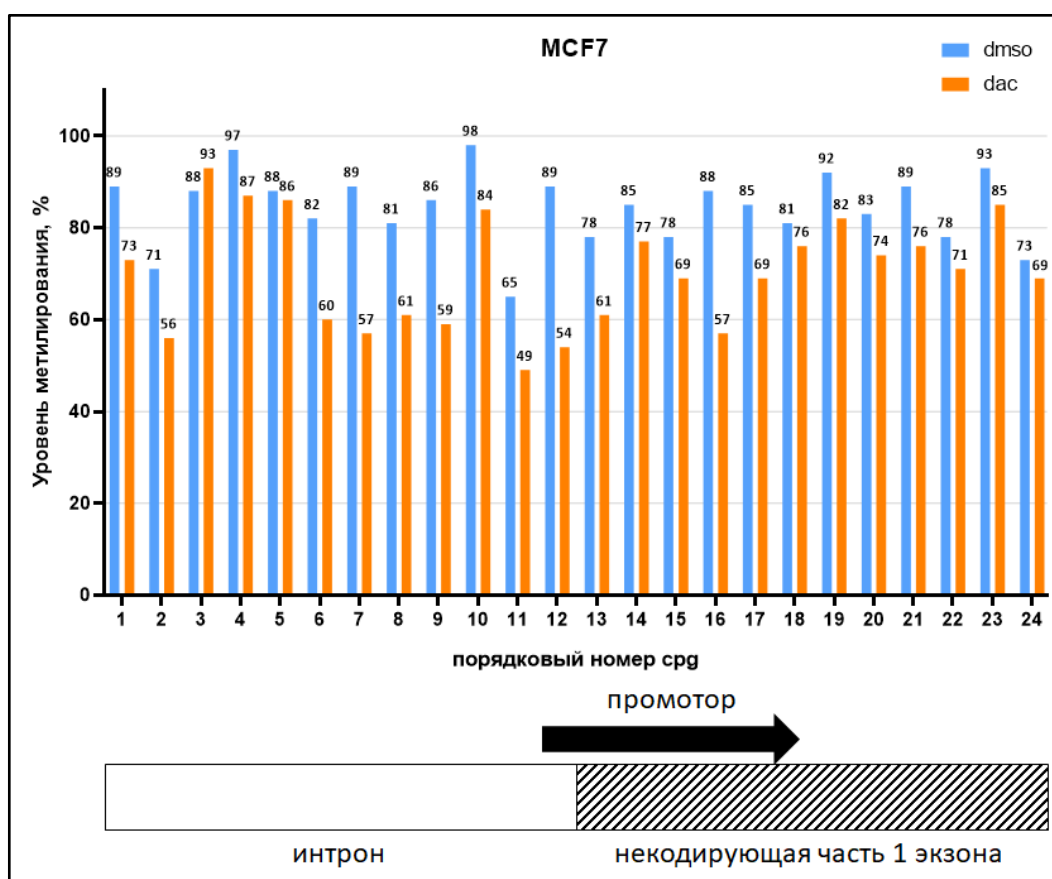
Другим потенциальным механизмом эпигенетического молчания CRABP1 в максимально резистентных клетках могло быть деацетилирование гистонов, которое подавляет экспрессию за счет конденсации нуклеосом. Для проверки возможного влияния

деацетилирования гистонов клетки обрабатывали TSA (трихостатин А, ингибитор деацетилазы гистонов). Согласно полученным данным, в обеих максимально резистентных линиях (MDA-MB-231 и HBL100) такая обработка не привела к значимому эффекту на экспрессию *CRABP1* (Ct=38-39 циклов). Более того, для клеток MDA-MB-231 комбинация DAC и TSA также не вызвала повышения уровня мРНК и, соответственно, белка CRABP1. При этом в случае HBL100 такая комбинированная обработка привела к сильному (более, чем 100-кратному) увеличению экспрессии *CRABP1* (Рисунок 20B). Однако и это сочетание, как и обработка DAC и TSA по отдельности, не привело к индукции белка.

Таким образом, обработка деметилирующим агентом всех РК-чувствительных, в отличие от резистентных, линий клеток РМЖ привела к усилению экспрессии CRABP1. В случае клеток с промежуточным уровнем резистентности, MDA-MB-468 и HCC1937, отсутствие эффекта вызвано очевидно изначальным отсутствием метилирования данного гена, поскольку клетки обеих линий отличаются высоким уровнем экспрессии как на уровне мРНК, так и белка CRABP1. На это указывают и результаты анализа клеток T47D, в которых отмечалось минимальное (среди РК-чувствительных линий) деметилирование при максимальном исходном уровне экспрессии *CRABP1*. В то же время в наиболее резистентных клетках глубокая репрессия *CRABP1* реализуется, вероятно, за счет нескольких механизмов эпигенетической регуляции, реализуемых как на транскрипционном, так и (для клеток HBL100) на пост-транскрипционном уровне.

Для проверки метилирования *CRABP1* мы выбрали линию MCF7, характеризующуюся минимальной экспрессией мРНК при достаточно высоком уровне белка, и исследовали область гена перед первым экзоном, так как по данным литературы эта область метилирована в большей степени связана с отсутствием экспрессии *CRABP1* [235].

Методом бисульфитного пиросеквенирования ДНК клеток MCF7 с использованием специфических биотинилированных праймеров (последовательности приведены в разделе «Материалы и методы») было показано, что базальный уровень метилирования всех сайтов исследованной нами промоторной области гена *CRABP1* в клетках MCF7 очень высокий (среднее значение - 84%, максимальное значение – 98%) (Рисунок 21). Обработка DAC привела к снижению уровня метилирования практически всех исследованных срг-участков. В некоторых участках деметилирование достигало 35% по абсолютному значению.



Показан базальный уровень метилирования конкретных срг-участков и их расположение на интроне/экзоне гена *CRABP1* (DMSO) и после обработки деметилирующим агентом (DAC)

Рисунок 21 - Уровень метилирования сайтов промоторной области гена *CRABP1*

Такой высокий уровень метилирования *CRABP1* объясняет столь низкую экспрессию данного гена. Деметилирование, в свою очередь, приводит к значимому дозозависимому повышению мРНК, что согласуется с нашими предыдущими результатами (Рисунки 19А и 20А).

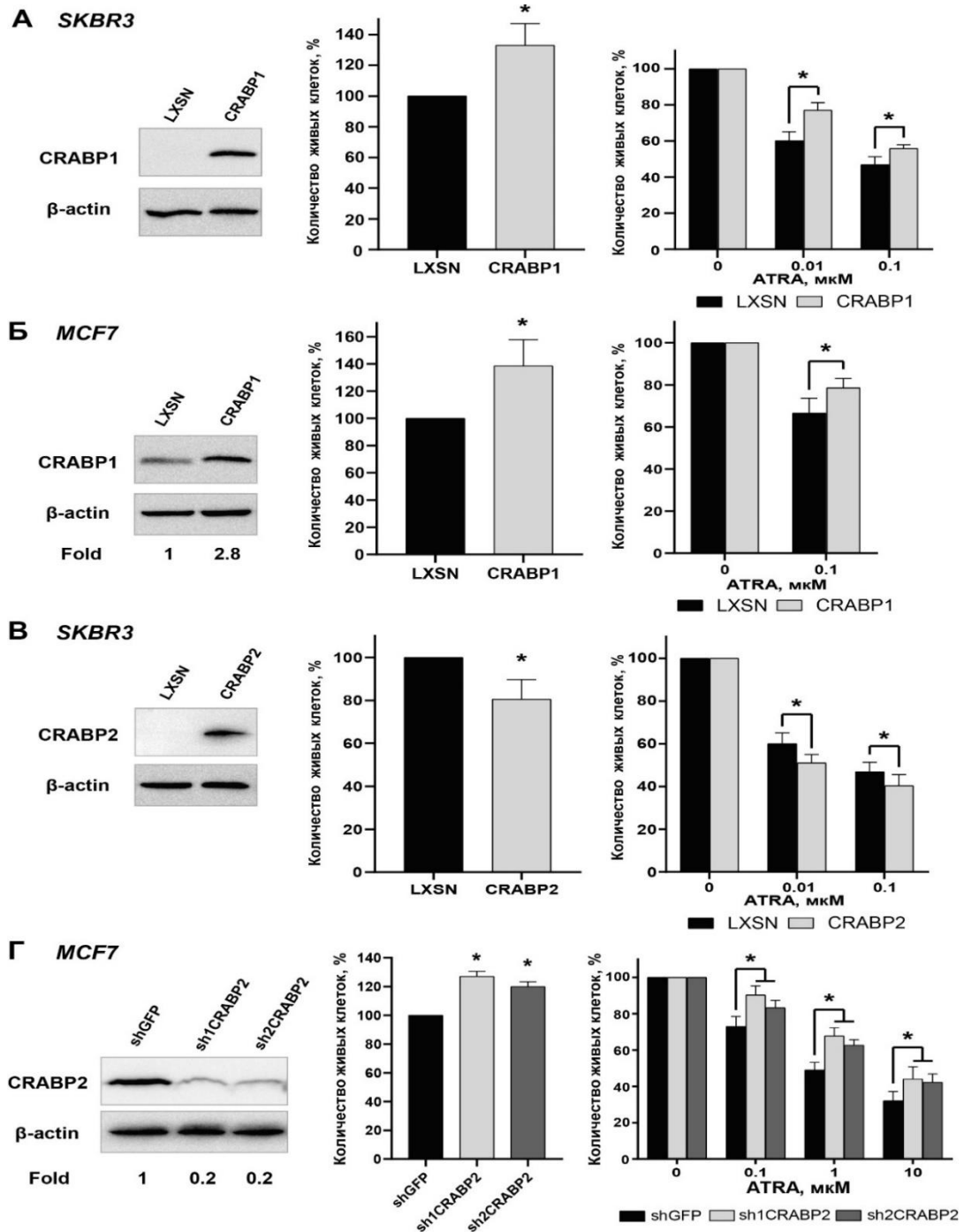
3.2 Исследование роли белков *CRABP1* и *CRABP2* в регуляции пролиферации и чувствительности к ретиноевой кислоте клеток рака молочной железы

Результаты анализа экспрессии *CRABP1* и *CRABP2* показали, что по мере снижения РК-чувствительности наблюдается увеличение уровня мРНК (особенно выраженное для *CRABP2*), однако в максимально-резистентных линиях обнаруживается полное эпигенетическое молчание обоих генов, реализуемое с помощью разных механизмов транскрипционной и пост-транскрипционной регуляции. Мы предположили, что связь CRABP с РК-чувствительностью является более сложной, то есть РК-чувствительность может определяться совокупностью факторов, включая активность белков CRABP. Более того, характер этой связи может, по-

видимому, изменяться в зависимости от исходной чувствительности клеток к РК, степени их злокачественности, гормонального статуса и других факторов. Поэтому далее мы решили напрямую оценить влияние экспрессии каждого из белков, CRABP1 и CRABP2, на чувствительность к РК клеток РМЖ с различным базовым уровнем чувствительности/резистентности и различным гормональным статусом. Параллельно мы оценивали влияние каждого из гомологов на скорость роста тех же клеток в стандартных условиях культивации, что является одной из основных характеристик уровня малигнизации и одним из важнейших показателей опухолевой прогрессии.

На первом этапе мы исследовали влияние CRABP1 на пролиферацию и РК-резистентность максимальной чувствительной линии SKBR3, характеризующейся отсутствием эндогенной экспрессии данного белка. Для этой задачи была получена стабильная производная сублиния с гиперэкспрессией *CRABP1*. Трансдукцию CRABP1 в клетки SKBR3 проводили методом псевдоретровирусной инфекции с использованием ретровирусного вектора pLXSN, в который была клонирована кодирующая последовательность *CRABP1*, и последующим отбором экспрессирующих вектор клеток на генетичине. Результаты проверки экзогенной экспрессии *CRABP1* в полученной сублинии, а также сравнения роста в стандартных условиях культивации и в присутствии АТРА клеток с гиперэкспрессией *CRABP1* и контрольных клеток, экспрессирующих вектор без вставки, приведены на Рисунке 22А. Согласно полученным данным, экзогенная экспрессия CRABP1 приводит к увеличению как пролиферации, так и РК-резистентности клеток (снижение РК-чувствительности).

Для того, чтобы оценить универсальность эффекта CRABP1 в отношении РК-чувствительных клеток, мы выбрали клетки MCF7, относящиеся к группе «средне-РК-чувствительных» линий. В связи с тем, что в данной линии клеток мРНК *CRABP1* определялась на грани достоверности метода ОТ-ПЦР, влияние CRABP1 изучали также с помощью его гиперэкспрессии, для чего кодирующую последовательность трансдуцировали в составе того же вектора pLXSN. Это привело к увеличению продукции белка CRABP1 более, чем в три раза, по сравнению с контрольной линией MCF7pLXSN (Рисунок 22Б). Гиперэкспрессия *CRABP1* привела к достоверному повышению как пролиферации клеток MCF7 (рост в стандартных условиях культивирования), так и РК-резистентности (Рисунок 22Б). Таким образом, как и в случае с SKBR3, экспрессия CRABP1 способствует малигнизации клеток MCF7 и снижает их чувствительность к РК. Полученные результаты согласуются с гипотетической ролью CRABP1 в снижении биодоступности РК за счет секвестрирования ее в цитоплазме и поддержания в неактивном состоянии, а также в “противодействии” CRABP2, который, как уже говорилось, считается преимущественно опухолевым супрессором, реализующим дифференцировочную, про-апоптотическую и анти-пролиферативную активность РК.



А. Влияние экзогенной экспрессии *CRABP1* на рост клеток SKBR3 в стандартных условиях культивации и в присутствии ATRA. Б. Влияние экзогенной экспрессии *CRABP1* на те же характеристики клеток MCF7. В. Влияние экзогенной экспрессии *CRABP2* на пролиферацию клеток SKBR3 в стандартных условиях и в присутствии ATRA. Г. Влияние нокдауна *CRABP2* на те же исследуемые характеристики клеток MCF7.

Количественный обсчет изменений экспрессии белков CRABP представлен на основании результатов денситометрического анализа, нормированных на уровень референсного белка β-актина («Fold»); звездочками указаны статистически значимые отличия при $p < 0.05$. Здесь, а также далее на рисунках 23 и 24, в левой панели представлены результаты вестерн-блот анализа экспрессии белков CRABP после соответствующих генетических модификаций, в центральной панели - результаты анализа роста клеток в стандартных условиях культивации, в правой панели - результаты анализа роста в присутствии ATRA.

Рисунок 22 - Влияние модификации экспрессии CRABP на пролиферацию и уровень чувствительности к ретиноевой кислоте РК-чувствительных клеток MCF7 и SKBR3

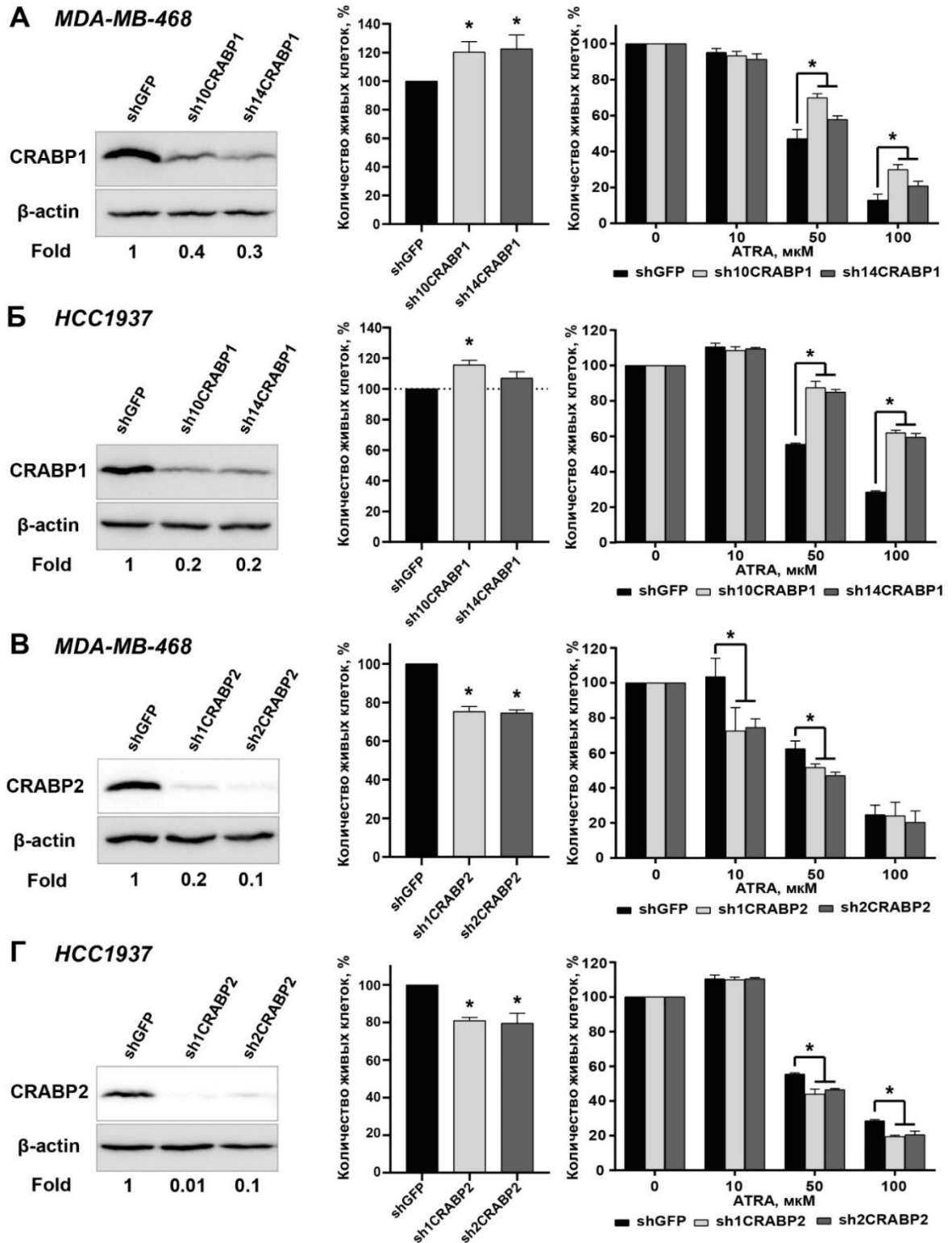
Для проверки данной гипотезы и выявления функциональной роли CRABP2, мы проанализировали его воздействие на исследуемые свойства тех же клеточных линий SKBR3 и MCF7. В клетках SKBR3, отличающихся крайне низким уровнем эндогенной экспрессии обоих гомологов, оценивали эффект гиперэкспрессии CRABP2. Для этого кодирующая последовательность *CRABP2* была клонирована в тот же ретровирусный вектор pLXSN и трансдуцирована в клетки. Эффективность трансдукции подтвердилась значительным повышением уровня белка CRABP2 (в 2.8 раза согласно денситометрическому анализу) в полученной сублинии (Рисунок 22В). Полученные производные сублинии SKBR3 по сравнению с контролем характеризовались снижением пролиферации и еще большей чувствительностью к действию РК. Таким образом, как в клетках SKBR3, так и в MCF7, гиперэкспрессия CRABP2 привела к эффекту, противоположному эффекту гиперэкспрессии CRABP1.

В связи с тем, что в клетках MCF7 базовый уровень мРНК *CRABP2* был достаточно высокий (Рисунок 19А), для данной линии клеток была возможность использовать более эффективный подход к изучению влияния белка CRABP2 с помощью подавления его эндогенной экспрессии (в случае CRABP1 крайне низкий уровень экспрессии не позволял использовать данный подход). Нокдаун CRABP2 проводили с помощью экспрессии двух последовательностей shRNA, CRABP2 sh1 и CRABP2 sh2 (последовательности малых шпилечных РНК приведены в разделе «Материалы и методы»). Стабильные производные сублинии получали с помощью трансдукции указанных последовательностей, клонированных в лентивирусный вектор pLKO.1-риго, методом псевдовирусной инфекции. В качестве контрольной параллельно была получена производная линия MCF7shGFP, экспрессирующая shRNA к зеленому флуоресцентному белку в составе того же вектора. Проверка эффективности нокдауна выявила 5-кратное снижение уровня белка CRABP2 по сравнению с контролем в обеих сублиниях MCF7(sh1CRABP2 и sh2CRABP2) (Рисунок 22Г). Анализ пролиферации клеток в стандартных условиях культивации и выживаемости при обработке АТРА выявил увеличение роста и РК-резистентности клеток обеих производных сублиний с нокдауном CRABP2 (Рисунок 22Г). Таким образом подавление экспрессии *CRABP2* приводит к тому же эффекту на характеристики клеток MCF7, что и гиперэкспрессия *CRABP1* в тех же клетках (а также в линии SKBR3). Полученные результаты означают, что в РК-чувствительных клетках функции белков CRABP1 и CRABP2 как в отношении проведения ретинового сигналинга, так и в опухолевой прогрессии, являются противоположными: CRABP1 способствует росту и РК-резистентности, а CRABP2 подавляет рост и делает клетки более чувствительными к РК. Эти данные подтверждает приведенную выше гипотезу об опухоль-супрессорной роли CRABP2 и конкурентной модели взаимодействия CRABP1 и CRABP2.

На первом этапе были выбраны две клеточные линии, относящиеся к группе «средне резистентных», HCC1937 и MDA-MB-468, поскольку для клеток данной группы линий имеется наибольший потенциальный диапазон изменения РК-чувствительности в обе стороны (повышения и понижения). Также важно, что в обеих линиях была возможность проведения нокдауна *CRABP1* и *CRABP2*, поскольку обе линии характеризуются высоким уровнем экспрессии обоих гомологов как на уровне мРНК, так и белка. Экспрессию *CRABP1* в клетках HCC1937 и MDA-MB-468 подавляли с помощью описанного выше подхода, для РНК-интерференции использовали малые шпилечные РНК sh10 и sh14 к *CRABP1*, последовательности которых были клонированы в вектор pLKO.1-puro. Стабильные производные сублинии получали после трансдукции данных последовательностей методом псевдолентивирусной инфекции и отбора модифицированных клеток на пурамицине. По результатам оценки эффективности нокдауна *CRABP1* в производных сублиниях MDA-MB-468, sh10*CRABP1* и sh14*CRABP1* выявлено подавление продукции белка в 2.5 и 3.3 раза соответственно. В обеих производных линии HCC1937, sh10*CRABP1* и sh14*CRABP1*, уровень белка снизился в 5 раз - (Рисунки 23А и 23Б).

К нашему удивлению, нокдаун *CRABP1* во всех случаях стимулировал как пролиферацию, так и РК-резистентность (Рисунки 23А и 23Б). При этом в единственной из полученных производных клеток, сублинии HCC1937sh14, различия в уровне пролиферации по сравнению с контролем не достигали статистической значимости, хотя наблюдалась та же тенденция к увеличению пролиферации. Необходимо подчеркнуть, что подавление экспрессии *CRABP1* приводило к аналогичному эффекту в клетках обеих линий, HCC1937 и MDA-MB-468, а также отметить сонаправленное изменение роста и выживания клеток во всех случаях. В целом, полученные результаты свидетельствуют о том, что в РК-резистентных клетках *CRABP1* обладает опухоль-супрессорной активностью и усиливает их чувствительность к РК, то есть по сравнению с РК-чувствительными клетками, функциональное значение данного белка меняется на противоположное.

В связи с полученными данными о различной роли *CRABP1* в клетках с разной РК-чувствительностью, вопрос о функциональном значении *CRABP2* в тех же клетках, представлял особенный интерес. Производные сублинии получали аналогично с использованием тех же последовательностей малых шпилечных РНК к *CRABP2*, sh1*CRABP2* и sh2*CRABP2*. Оценка эффективности нокдауна в производных сублиниях MDA-MB-468 (sh1*CRABP2* и sh2*CRABP2*) выявила снижение уровня *CRABP2* в 5 и 10 раз соответственно. В производных сублиниях HCC1937 (sh1*CRABP2* и sh2*CRABP2*) продукция *CRABP2* снижалась в 100 и 10 раз соответственно (Рисунки 23В и 23Г).



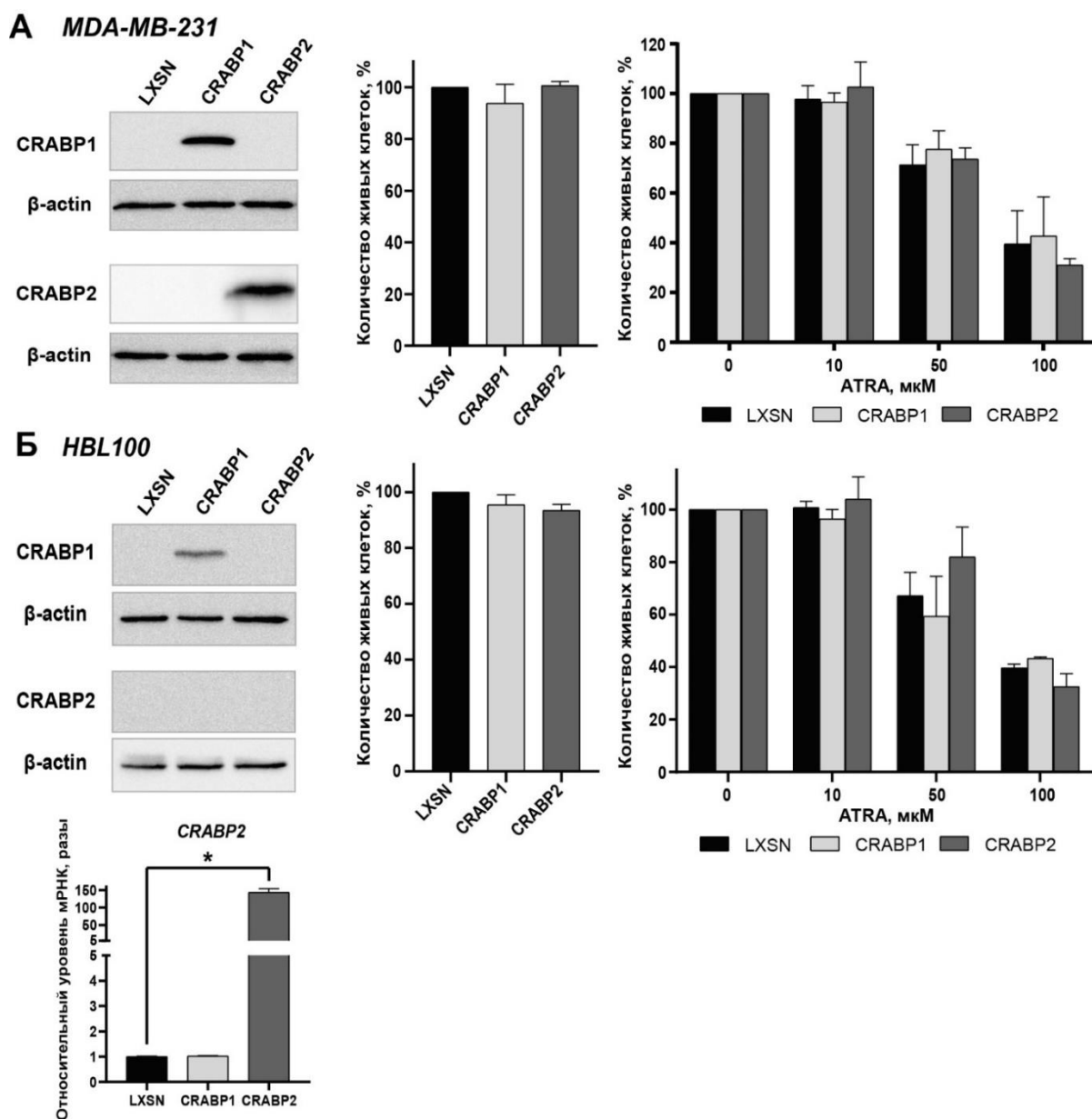
А. Влияние подавления эндогенной экспрессии *CRABP1* на пролиферацию клеток MDA-MB-468 в стандартных условиях и в присутствии ATRA. Б. Влияние подавления эндогенной экспрессии *CRABP1* на пролиферацию клеток HCC1937 в стандартных условиях и в присутствии ATRA. В. Влияние подавления эндогенной экспрессии *CRABP2* на пролиферацию клеток MDA-MB-468 в стандартных условиях и в присутствии ATRA. Г. Влияние подавления эндогенной экспрессии *CRABP2* на пролиферацию клеток HCC1937 в стандартных условиях и в присутствии ATRA.

Рисунок 23 - Влияние нокдауна *CRABP* на пролиферацию и РК-чувствительность средне-резистентных клеток MDA-MB-468 и HCC1937 («*» - $p < 0.05$)

По результатам сравнительного анализа роста клеток полученных производных сублиний подавление CRABP2 в обоих случаях вызвало снижение пролиферации и устойчивости к РК (Рисунки 23В и 23Г). Таким образом, как и в предыдущих случаях, наблюдалось сонаправленное изменение обеих исследуемых характеристик, причем нокдаун CRABP2 оказывал эффект противоположный тому, который оказывал нокдаун CRABP1. При этом в клетках обеих производных сублиний MDA-MB-468 sh1 и MDA-MB-468 sh2 значимое снижение роста возникало уже начиная с 10мкМ АТРА, а при обработке АТРА в концентрации 100мкМ различия терялись (вероятно вследствие неспецифической гибели клеток). В то же время в производных сублиниях HCC1937 значимое снижение количества живых клеток детектировано при обработке АТРА начиная с 50мкМ и более. Полученные результаты свидетельствуют о том, что подавление экспрессии CRABP1 и CRABP2 в клетках из группы «средне-РК-резистентных» линий оказывает противоположное друг другу воздействие как в на рост клеток в стандартных условиях культивации, так и на их РК-чувствительность. Таким образом, данные, полученные как на РК-чувствительных линиях MCF7 и SKBR3, так и на более резистентных клетках MDA-MB-468 и HCC1937 свидетельствуют о противоположном функциональном значении двух гомологов CRABP в отношении исследуемых характеристик. При этом влияние каждого из белков CRABP на обе характеристики меняется на противоположное в РК-резистентных линиях по сравнению с РК-чувствительными.

В связи с полученными результатами мы далее исследовали влияние каждого из гомологов CRABP на клетки, относящиеся к группе «максимально РК-резистентных» линий, MDA-MB-231 и HBL100. В связи с тем, что в обеих линиях мРНК обоих генов регистрировалась на крайне низком уровне, а продукция обоих белков практически отсутствовала, в данном случае, как и в случае с CRABP1 в клетках MCF7 и SKBR3, влияние обоих гомологов CRABP анализировали с помощью экзогенной экспрессии. Для этого были получены производные сублинии MDA-MB-231 и HBL100 с гиперэкспрессией *CRABP1* и *CRABP2*. Результаты проверки экзогенной экспрессии каждого из белков представлены на рисунке 24. По результатам исследования производных линий MDA-MB-231 гиперэкспрессия как *CRABP1*, так и *CRABP2*, не повлияла на пролиферацию и РК-резистентность клеток (Рисунок 24А). Также не было выявлено значимых изменений исследуемых характеристик для производных сублиний HBL100. Интересно, что в отличие от *CRABP1*, гиперэкспрессия *CRABP2* в клетках HBL100 при увеличении уровня мРНК более, чем в 100 раз (по результатам ОТ-ПЦР-РВ анализа трех независимо полученных производных сублиний) не повлияла на продукцию белка (Рисунок 24Б). В этой связи интересно напомнить, что именно в той же линии HBL100 аналогичное более чем 100-кратное повышение уровня мРНК *CRABP1* в результате деметилирования ДНК и подавления деацетилирования гистонов также не сопровождалось

повышением уровня белка CRABP1, что может свидетельствовать об активации в этих клетках механизмов посттранскрипционной репрессии обоих гомологов.



А. Влияние экзогенной экспрессии гомологов *CRABP* на пролиферацию клеток MDA-MB-231 в стандартных условиях и в присутствии ATRA. **Б.** Влияние экзогенной экспрессии гомологов *CRABP* на пролиферацию клеток HBL100 в стандартных условиях и в присутствии ATRA. Сравнение экспрессии мРНК *CRABP2* в производных субклинах.

Рисунок 24 - Влияние экзогенной экспрессии *CRABP* на пролиферацию и РК-чувствительность клеток MDA-MB-231 и HBL100 (Статистически значимыми считали значения $p < 0.05$, на рисунке обозначены как «*»)

Подводя итоги данной части работы можно заключить, что максимально устойчивые к РК клетки трижды-негативного подтипа РМЖ характеризуются отсутствием эндогенной экспрессии обоих белков CRABP, а экзогенная экспрессия каждого из гомологов не оказывает влияния на рост и РК-чувствительность данных клеток. Интересно, что гиперэкспрессия *CRABP2* в производных обеих линий не сопровождалась увеличением продукции CRABP1, и наоборот. Отсутствие данного эффекта свидетельствует об утрате максимально резистентными клетками взаимосвязи между экспрессией двух гомологов CRABP, показанной нами для клеток РК-чувствительных и средне-резистентных линий.

Результаты анализа влияния экспрессии белков CRABP1 и CRABP2 на характеристики клеток РМЖ суммированы в таблице 6.

Таблица 6 - Функциональное значение белков CRABP1 и CRABP2 в регуляции пролиферации и РК-резистентности клеток РМЖ с различным гормональным статусом и разным уровнем РК-чувствительности

Исходная РК-чувствительность	Чувствительные				Средне-резистентные				Максимально резистентные			
	HER2(+)		ER(+)		трижды-негативный РМЖ				трижды-негативный РМЖ			
Линия РМЖ	SKBR3		MCF7		HCC1937		MDA-MB-468		MDA-MB-231		HBL100	
Значение в пролиферации/ РК-резистентности	рост	рез.	рост	рез.	рост	рез.	рост	рез.	рост	рез.	рост	рез.
CRABP1	↑	↑	↑	↑	↓	↓	↓	↓	-	-	-	-
CRABP2	↓	↓	↓	↓	↑	↑	↑	↑	-	-	-	н/и*

* н/и – нет информации

Суммируя данные анализа экспрессии CRABP1 и CRABP2 в клетках РМЖ с различным уровнем РК-чувствительности, а также роли белков CRABP в РК-резистентности и прогрессии РМЖ, можно сделать следующие выводы: 1. Во всех исследованных РК-чувствительных линиях клеток экспрессия *CRABP1* ограничивается метилированием гена, при этом уровень белка CRABP1 варьирует в широком диапазоне от отсутствия до высокого уровня, в большей степени обусловленного, вероятно, высокой стабильностью продукта. Для группы средне РК-резистентных линий характерен высокий уровень экспрессии как мРНК, так и белка CRABP1, который не меняется при деметилировании гена. В максимально резистентных линиях

наблюдается глубокая репрессия CRABP1, осуществляемая с помощью нескольких механизмов на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях. 2. Продукция белков CRABP1 и CRABP2 коррелирует между собой во всех исследуемых линиях вне зависимости от происхождения и РК-чувствительности ($r=0,8921$, $p<0.0001$). 3. Белки CRABP1 и CRABP2 обладают противоположным функциональным значением в отношении регуляции роста и РК-чувствительности /резистентности клеток РМЖ: в РК-чувствительных клетках CRABP1 способствует повышению пролиферации и РК-резистентности, то есть обладает опухоль-промоторной активностью, в то время как CRABP2 проявляет опухоль-супрессорную активность, негативно регулируя пролиферацию и повышая чувствительность клеток к РК. В более резистентных клетках роль каждого из гомологов CRABP меняется на противоположную. 4. Максимально резистентные клетки характеризуются глубокой репрессией обоих гомологов, а экзогенная экспрессия каждого из белков не влияет на исследуемые характеристики. В этих же клетках отсутствует и регуляторная связь между двумя гомологами (CRABP2-зависимая регуляция CRABP1). Гипотетическая модель участия CRABP1 и CRABP2 в опухолевой прогрессии и РК-резистентности приведена на рисунке 30 в разделе «Обсуждение результатов».

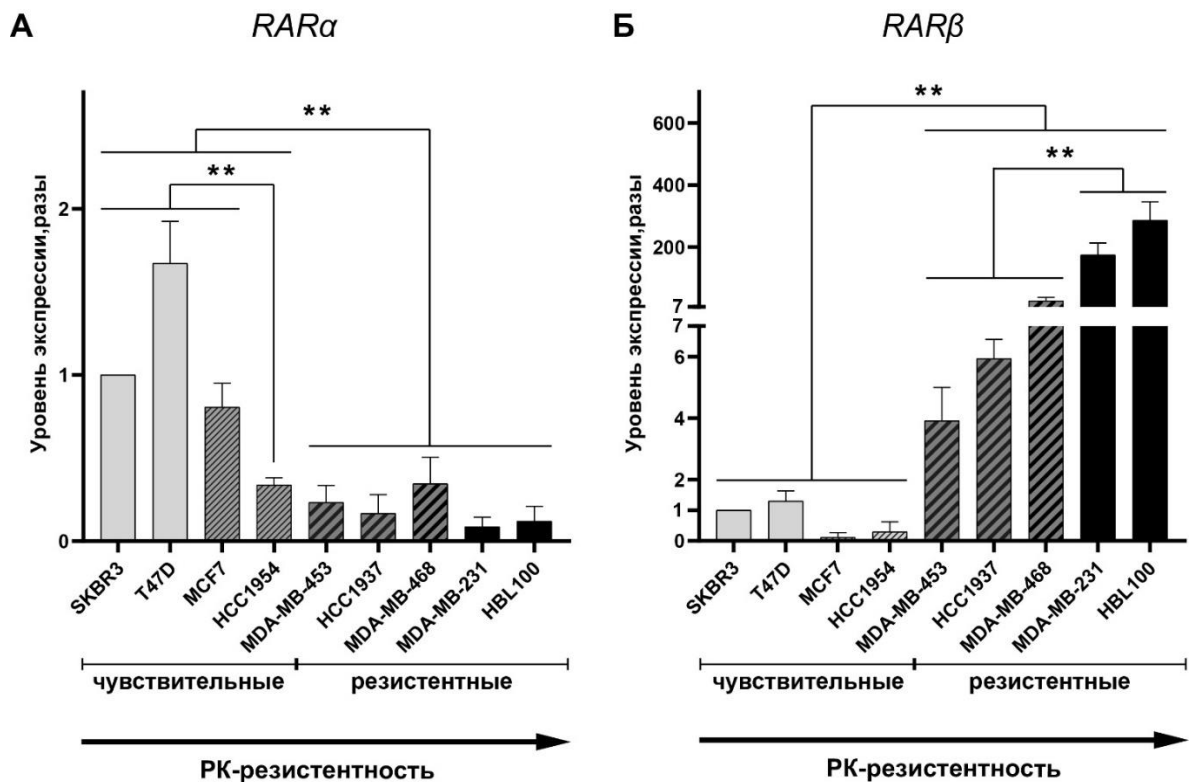
3.3 Анализ экспрессии ядерных рецепторов ретиноевой кислоты, $RAR\alpha$ и $RAR\beta$, в клетках рака молочной железы с разным уровнем чувствительности к ретиноевой кислоте

Наряду с исследованными факторами, потенциально регулирующими РК-чувствительность, в формировании РК-резистентности могут быть задействованы другие участники ретиноевого сигналинга, в первую очередь, ядерные рецепторы РК (прежде всего $RAR\alpha$ и $RAR\beta$), а также ферменты катаболизма РК – цитохромы CYP26A1 и CYP26B1.

Для изучения возможной связи рецепторов РК с РК-чувствительностью/резистентностью мы провели сравнительный анализ экспрессии $RAR\alpha$ и $RAR\beta$ в той же панели клеточных линий РМЖ. По данным ОТ-ПЦР в реальном времени уровни мРНК обоих рецепторов в группе РК-чувствительных и РК-резистентных клеток достоверно отличаются ($p<0,001$) (Рисунок 25). Так, в РК-чувствительных клетках экспрессия $RAR\alpha$ был существенно выше по сравнению с РК-резистентными клетками. Более того, наиболее чувствительные линии T47D и SKBR3 демонстрировали максимальный уровень экспрессии $RAR\alpha$, а клетки HCC1954, отличающиеся наименее выраженным в группе РК-чувствительных линий снижением пролиферации под действием АТРА отличались и наименьшим уровнем мРНК $RAR\alpha$ по сравнению с другими линиями из данной группы ($p<0,05$). Более того, данные статистического анализа подтвердили наличие в группе РК-чувствительных линий значимого тренда - линейной зависимости снижения уровня мРНК $RAR\alpha$ от уменьшения РК-чувствительности ($p<0,05$). Иными словами, в

клетках РМЖ экспрессия *RARα* снижается по мере увеличения уровня РК-резистентности (Рисунок 25А).

Анализ экспрессии мРНК *RARβ* в клетках РМЖ показал обратную картину: уровень *RARβ* в РК-чувствительных клетках был значительно ниже, чем в РК-резистентных ($p < 0.05$). Более того, в группе устойчивых линий максимально РК-резистентные клетки (MDA-MB-231 и HBL100) характеризовались наивысшей экспрессией *RARβ* ($p < 0.05$). Таким образом, экспрессия *RARβ* в клетках РМЖ изменяется сонаправленно с уровнем РК-резистентности (Рисунок 25Б).



А. Относительный уровень экспрессии мРНК *RARα* в клетках РМЖ. Б. Относительный уровень экспрессии мРНК *RARβ* в клетках РМЖ.

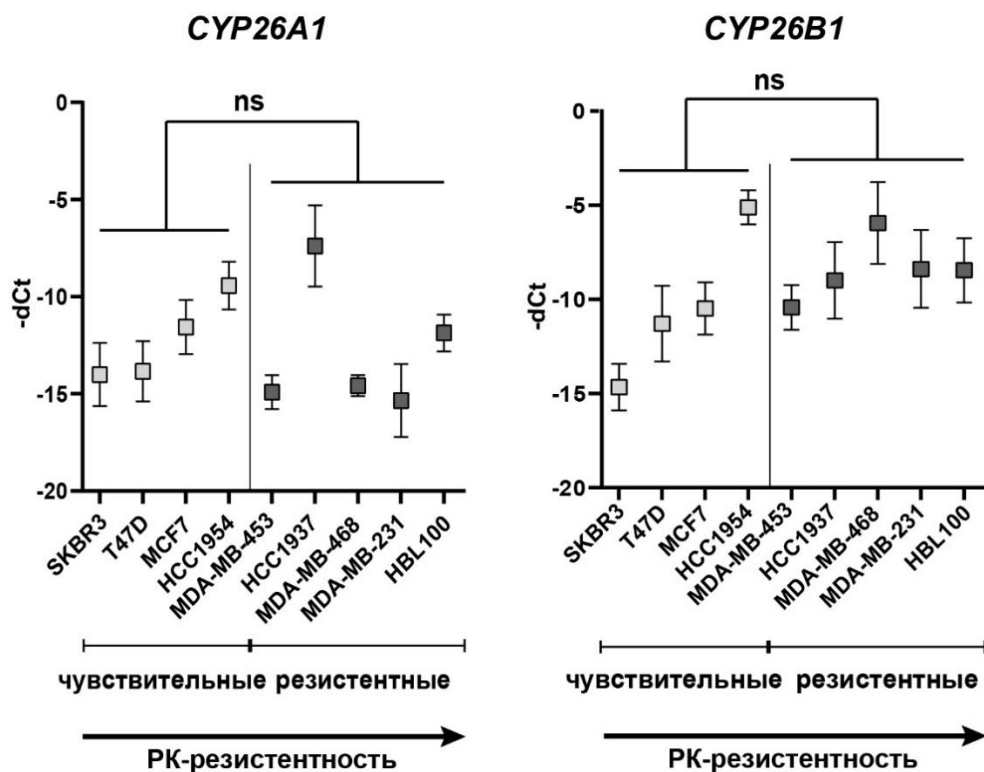
Значение уровня экспрессии *RARα* или *RARβ* в клетках SKBR3 было принято за единицу. В качестве референсного гена использовался *RPL27*. Группы линий с разной РК-чувствительностью (см. Таблица 5) объединены одним типом штриховки. ** - $p < 0.01$

Рисунок 25 - Относительная экспрессия генов *RARα* и *RARβ* в группах РК-чувствительных и РК-резистентных клеток

В целом, в ряду клеток РМЖ с повышением уровня РК-резистентности (обозначена стрелкой на рисунке 25) происходит снижение уровня *RARα* и повышение уровня *RARβ*. Такое противоположное изменение экспрессии рецепторов RAR может быть одним из механизмов формирования РК-резистентности клеток РМЖ.

3.4 Анализ экспрессии цитохромов *CYP26A1* и *CYP26B1* в клетках рака молочной железы с разным уровнем чувствительности к ретиноевой кислоте

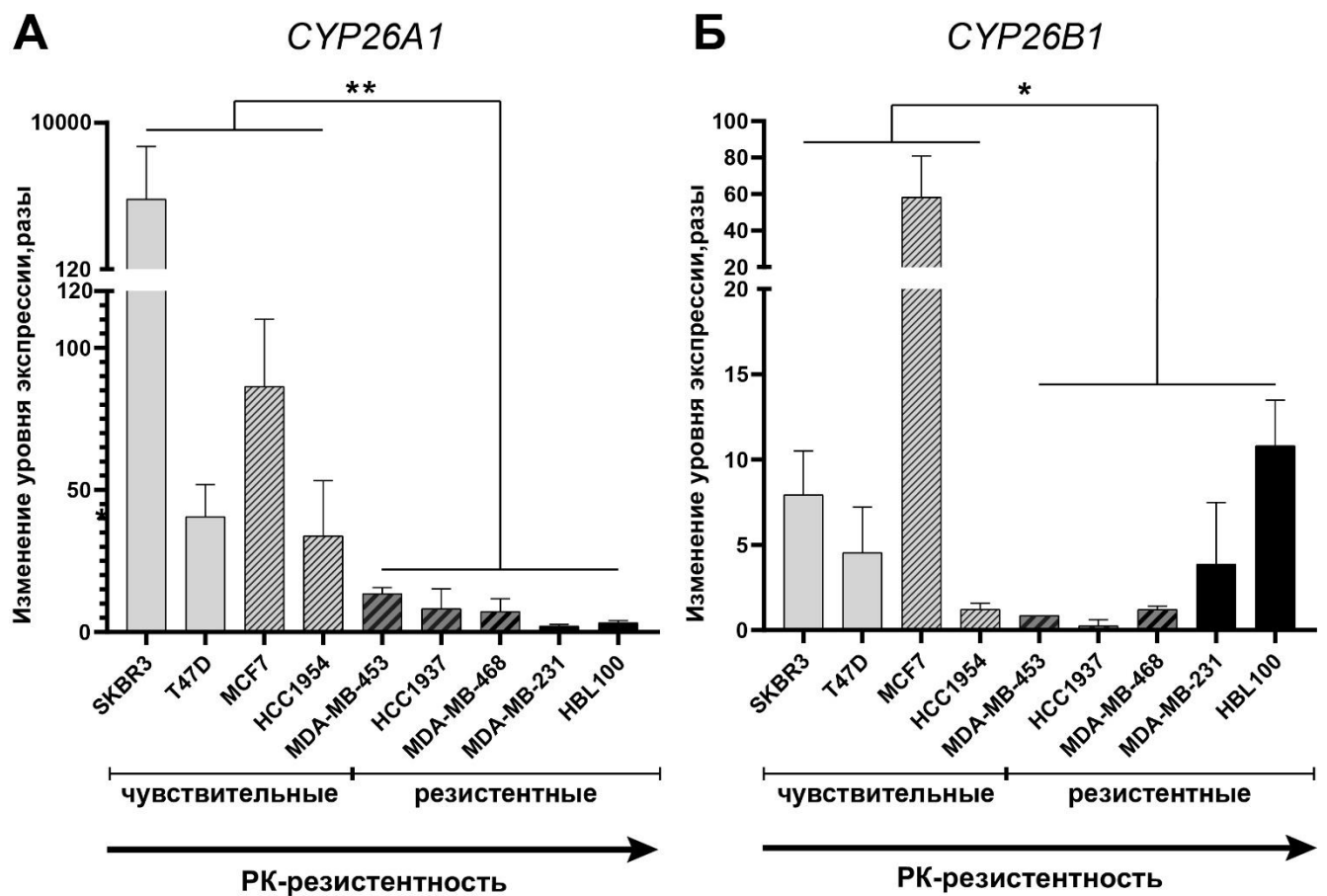
Для исследования гипотетической связи РК-чувствительности с экспрессией ферментов, осуществляющих катаболизм РК, мы далее сравнили уровни мРНК цитохромов *CYP26A1* и *CYP26B1* в клетках той же экспериментальной модели. При сравнении уровня экспрессии *CYP26A1* и *CYP26B1* в клетках при стандартных условиях культивации достоверных различий между группами РК-чувствительных и РК-резистентных линий выявлено не было. Для *CYP26A1* был показан в целом достаточно низкий уровень экспрессии, особенно для отдельных РК-чувствительных линий клеток. При этом в максимально РК-чувствительных клетках SKBR3 экспрессия *CYP26A1* практически отсутствовала - детекция сигнала начиналась со значений более 40 циклов, то есть за пределами диапазона достоверности метода ПЦР. Практически все линии вне зависимости от их РК-чувствительности/резистентности характеризовались более высоким уровнем мРНК *CYP26B1* по сравнению с *CYP26A1* (Рисунок 26).



Сравнение относительной экспрессии *CYP26A1* и *CYP26B1*. Значимых различий в группах РК-чувствительных и РК-резистентных линий РМЖ не выявлено. Результаты представлены в виде значений **-dCt** для каждого гена. В качестве референсного гена использовался *RPL27*

Рисунок 26 - Соотношение относительной экспрессии *CYP26A1* и *CYP26B1* в отсутствие АТРА в клетках РК-чувствительных и РК-резистентных линий

В связи с тем, что экспрессия цитохромов может индуцироваться при повышении концентрации субстрата, мы далее изучили возможный эффект АТРА в отношении активации экспрессии *CYP26A1* и *CYP26B1*. Для этой задачи был проведен сравнительный анализ мРНК *CYP26A1* и *CYP26B1* в клетках при стандартных условиях культивации и при добавлении АТРА в концентрации 1мкМ. Сравнение уровней экспрессии *CYP26A1* и *CYP26B1* до и после инкубации с АТРА оценивали методом $\Delta\Delta C_t$. Полученные значения, выраженные в относительных единицах (разы изменения по сравнению с контролем), соответствуют уровню АТРА-зависимой активации экспрессии цитохромов в клетках исследуемых линий. Результаты для цитохромов *CYP26A1* и *CYP26B1* представлены на рисунках 27А и 27Б, соответственно.



А. Относительная экспрессия *CYP26A1*. Разрыв в данных для линии SKBR3 описывает ситуацию, в которой экспрессия *CYP26A1* сильно (более чем в 100 раз) увеличивается после обработки АТРА при отсутствии достоверной детекции экспрессии в стандартных условиях культивации; **Б.** Относительная экспрессия *CYP26B1*.

По оси ординат отложено относительное изменение экспрессии исследуемого гена в размах по отношению к его экспрессии до обработки АТРА. Разрыв данных для линии MCF7 описывает ситуацию, в которой экспрессия *CYP26B1* после обработки АТРА увеличивается сильнее (более, чем в 50 раз), чем в остальных линиях. * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$

Рисунок 27 - Относительная экспрессия генов *CYP26A1* и *CYP26B1* после инкубации с АТРА в группах РК-чувствительных и РК-резистентных клеточных линий

Как видно на рисунке 27А, в группе РК-чувствительных линий уровень индукции *CYP26A1* был существенно выше, чем в резистентных линиях ($p < 0,001$). Эти данные свидетельствуют о том, что РК-чувствительные клетки способны более эффективно утилизировать РК при повышении ее концентрации. Различия в уровне индукции экспрессии *CYP26B1* между группами РК-чувствительных и РК-резистентных линий хотя и были менее выражены по сравнению с *CYP26A1*, но также были статистически достоверными ($p < 0,05$).

Суммируя результаты данного раздела можно заключить, что формирование РК-резистентности связано с выраженным снижением экспрессии ядерного рецептора $RAR\alpha$, а также со снижением РК-зависимой индукции экспрессии цитохромов *CYP26*. Соответственно, в РК-резистентных клетках происходит ограничение транскрипционной активности РК, однако и способность разлагать избыток РК у них меньше, что является скорее результатом, чем причиной РК-резистентности. Можно предположить, что резистентные клетки «защищаются» от анти-пролиферативной опухоль-супрессорной активности РК с помощью ограничения РК-зависимой внутриклеточной сигнализации путем снижения экспрессии $RAR\alpha$. По этой же причине (как минимум отчасти) РК-резистентные опухолевые клетки в меньшей степени «опасаются» повышения внутриклеточного уровня РК и, соответственно, ее анти-пролиферативной/про-апоптотической активности, в результате чего утрачивают способность быстро утилизировать избыток РК.

3.5 Исследование неканонической активности ретиноевой кислоты в отношении активации протеинкиназ АКТ и ERK1/2 в трансформированных клетках с разным уровнем чувствительности к ретиноевой кислоте и экспрессии *CRABP1*

Помимо основной транскрипционной активности РК, которая реализуется в ядре и приводит к активации ретиноид-респонсивных генов (многие из которых обладают про-апоптотической и/или антипролиферативной активностью), в нескольких работах показана так называемая «неканоническая» активность РК, которая заключается в нетранскрипционной активации ключевых сигнальных белков, вовлеченных в опухолевую прогрессию. В настоящее время такая активность РК показана для протеинкиназ АКТ, ERK1/2 и p38MAPK. РК-зависимое фосфорилирование данных протеинкиназ осуществляется на первых 5–60 минутах инкубации и касается уже синтезированного пула белков, тогда как более долговременная инкубация с РК вызывает изменения количества белковых продуктов и их активности с помощью транскрипционной активности РК, реализуемой посредством активации ее ядерных рецепторов (каноническая активность РК).

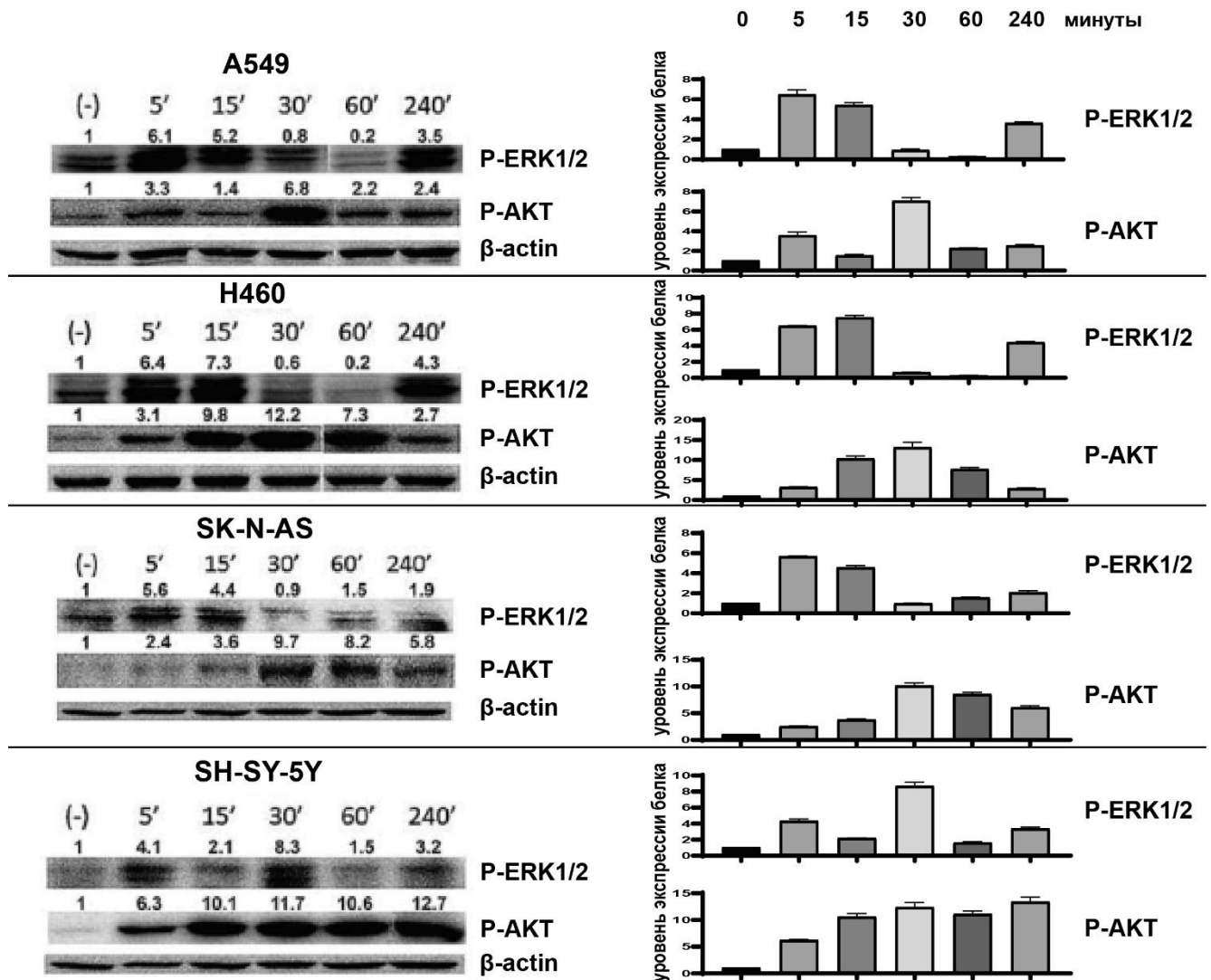
Предполагается, что это может вносить вклад в малигнизацию и РК-резистентность клеток. Согласно некоторым литературным данным, неканоническая активность РК реализуется с помощью белка CRABP1 [168, 169]. В этой связи мы исследовали РК-зависимую активацию протеинкиназ АКТ и ERK1/2 в клетках, характеризующихся разной РК-чувствительностью и разным уровнем продукции CRABP1. Для исследования выбрали максимально РК-чувствительные клетки (линии нейробластомы) с высоким уровнем CRABP1 и максимально резистентные клетки (линии НМРЛ) с отсутствием продукции данного белка.

Влияние РК на активность протеинкиназ ERK1/2 и АКТ изучали в клетках НМРЛ и нейробластомы, для чего оценивали динамику активирующего фосфорилирования данных киназ в зависимости от времени инкубации с АТРА. Для киназы ERK1/2 методом иммуноблоттинга определяли уровень фосфорилирования остатков T202/Y204, для АКТ определяли статус фосфорилирования серина S473.

По результатам исследования РК-зависимая краткосрочная активация показана для обеих киназ и для всех исследуемых клеток. При этом заметно отличалась кинетика данного процесса (Рисунок 28). Так, для киназы ERK1/2 во всех исследуемых линиях были характерны два четких пика активации. Первый пик фосфорилирования наблюдался при 5–15 минутах инкубации с АТРА и соответствовал нетранскрипционной краткосрочной активации. В линии нейробластомы SH-SY-5Y продолжительность данного пика составляла 5–30 минут. Следующий пик наблюдался уже после 4 часов обработки, что соответствует долговременной (транскрипционной) активации данной киназы. При этом в промежутке между двумя пиками, при инкубации в течение 1 часа, детектировалось снижение фосфорилирования до уровня ниже исходного (контрольные клетки без обработки АТРА). Такое разграничение пиков фосфорилирования во времени свидетельствует о том, что эти процессы не связаны между собой напрямую и реализуются независимо друг от друга, в отличие от сценария, показанного в литературе для РК-зависимой активации p38MAPK.

Фосфорилирование киназы АКТ также возникало уже после 5 минут инкубации с АТРА и достигала максимального уровня после 30–60 минут обработки в различных клеточных линиях. При этом снижения фосфорилирования данной киназы до контрольного уровня не было отмечено ни в одной из исследованных клеточных линий. Такая кинетика фосфорилирования указывает на то, что в отличие от ERK1/2, активация АКТ с помощью нетранскрипционной и транскрипционной активности РК представляет собой сопряженный процесс «перетекания» из одной формы активации в другую. Такой эффект, как уже говорилось, был продемонстрирован для РК-зависимой активации p38MAPK. Согласно данному сценарию, фосфорилирование p38MAPK вследствие неканонической активности РК позволяет реализовывать транскрипционную RAR-опосредуемую активность РК [28, 88]. Несмотря на то,

что ERK1/2 и АКТ-ассоциированные сигнальные пути могут иметь пересечения, обнаруженная нами различная кинетика РК-зависимой активации данных киназ свидетельствует о разных механизмах, опосредующих неканоническую активность РК в отношении данных мишеней.



P-ERK1/2 – фосфорилирование ERK1/2 по T202/Y204

P-AKT – фосфорилирование АКТ по S473

Цифрами над дорожками указаны разы изменения уровня фосфорилирования в сравнении с контролем с учетом нормализации количества нанесенного белка по референсному белку β-актина.

Рисунок 28 - Анализ уровня фосфо-ERK1/2 (pThr202/Tyr204) и фосфо-АКТ (pSer473) после обработки АТРА клеток немелкоклеточного рака легкого и нейробластомы

Суммируя результаты данного раздела, мы обнаружили РК-зависимую краткосрочную активацию протеинкиназ ERK1/2 и АКТ, ключевых регуляторов опухолевой прогрессии,

играющих важную роль в малигнизации клеток. Полученные результаты свидетельствуют о том, что эффект неканонической активности РК универсален и не связан напрямую с РК-резистентностью, поскольку обнаруживается в клетках опухолей разных нозологий и с принципиально разным уровнем РК-чувствительности. Также полученные результаты свидетельствуют о том, что реализация неканонической активности РК не требует участия CRABP1, поскольку обнаруживается в том числе в клетках с отсутствием экспрессии CRABP1 (A549, H460). Различная динамика фосфорилирования ERK1/2 и АКТ, указывает на то, что РК-зависимая нетранскрипционная активация данных киназ реализуется с помощью различных механизмов.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Несмотря на активную разработку противоопухолевых препаратов на основе РК, проблема формирования резистентности злокачественными клетками до сих пор остается одним из основных ограничений применения натуральных и синтетических ретиноидов в клинической практике [142]. Молекулярные механизмы формирования РК-резистентности имеют по-видимому множество сценариев и включают множество факторов, опосредующих данный процесс. Одним из потенциальных «посредников» может являться белок, связывающий РК, CRABP1. Такое предположение имеет несколько обоснований, среди которых упомянутая выше максимальная аффинность CRABP1 к РК и предположительная функция ограничения ее транскрипционной активности за счет секвестрирования в цитоплазме. Помимо поддержания РК в неактивном состоянии, данный белок может способствовать катаболизму РК цитохромом CYP26A1 [231]. Косвенным свидетельством того, что CRABP1 участвует в регуляции биодоступности РК и предохраняет РК-чувствительные клетки от опухоль-супрессорной активности РК служат и многочисленные данные о метилировании гена *CRABP1* в ряде опухолей [124, 141, 205, 226, 235], относящихся преимущественно к РК-резистентным нозологическим типам.

Для выявления возможной связи CRABP1 с РК-чувствительностью нами проведен сравнительный анализ его экспрессии в клетках опухолей различного гистогенеза. С использованием различных экспериментальных моделей мы показали, что в клетках злокачественных опухолей, которые принято относить к РК-резистентным нозологиям, включая НМРЛ, глиобластомы и рак яичника, продукция CRABP1 либо отсутствует, либо крайне низка. В то же время клетки РК-чувствительных типов опухолей, прежде всего нейробластомы, характеризуются высоким уровнем данного белка. Высокий уровень экспрессии в клеточных линиях нейробластомы хорошо согласуется с ранее полученными в лаборатории данными анализа CRABP1 в тканях нейробластомы. Интересно, что в этой работе была показана связь экспрессии CRABP1 с уровнем дифференцировки клеток. В низкодифференцированных (наиболее агрессивных) опухолях экспрессия CRABP1 снижалась или отсутствовала [3].

Для более детального анализа связи экспрессии CRABP1 с РК-чувствительностью мы провели исследование на линиях клеток единой нозологии, а именно рака яичника. РЯ считается преимущественно РК-резистентным типом опухолей, однако степень РК-резистентности могла существенно различаться, что подтвердилось в наших исследованиях по анализу влияния АТРА на пролиферацию различных линий клеток РЯ. Анализ продукции CRABP1 в клетках РЯ, характеризующихся разным уровнем устойчивости к РК, выявил

отсутствие данного белка в максимально-резистентных клетках SK-OV-3, OVCAR-8 и EFO-21 и высокий уровень - в менее резистентных линиях OVCAR-3 и OVCAR-4.

Таким образом, результаты данного этапа исследования свидетельствовали о прямой связи РК-чувствительности с экспрессией CRABP1. Другим важным наблюдением было обнаружение корреляции между экспрессией белков CRABP1 и CRABP2. Так, вне зависимости от нозологического типа опухоли в клетках с отсутствием CRABP1 экспрессия CRABP2 была низкой, в то время как в клетках, в которых обнаруживался CRABP1, продукция CRABP2 была высокой. Таким образом мы наблюдали сходные различия в уровнях экспрессии CRABP1 и CRABP2 в исследуемых линиях, которые были более выраженными для CRABP1, что указывало на взаиморегуляцию продукции двух гомологов. Этот вопрос не исследовался за исключением единственной работы, ранее опубликованной сотрудниками лаборатории, в которой исследовалась экспрессия обоих гомологов, CRABP1 и CRABP2, в тканях аденокарциномы легкого. В этой работе было показано наличие корреляции между экспрессией CRABP1 и CRABP2 как на уровне мРНК, так и белка [73]. Интересно, что эта связь наблюдалась только на ранних стадиях заболевания и утрачивалась в ходе опухолевой прогрессии.

Для подтверждения гипотезы о связи CRABP1 с РК-чувствительностью клеток, а также для проверки универсальности обнаруженной корреляции между экспрессией белков CRABP1 и CRABP2 нам необходимо было выбрать экспериментальную модель, представленную клетками сходного происхождения, но с максимально широким диапазоном ответа на РК. Мы предположили, что таким вариантом может быть РМЖ, представляющий собой крайне гетерогенный тип злокачественных новообразований как по клинико-морфологическим, так и по молекулярным характеристикам. Кроме того, в литературе имелись данные, свидетельствующие о том, что чувствительность к РК различных линий сильно варьирует [36]. Также согласно некоторым данным, экспрессия CRABP1 регистрировалась в ряде клеток РМЖ [125, 169].

Результаты анализа влияния АТРА на пролиферацию клеток, проведенного с использованием 9 клеточных линий, подтвердил широкий спектр РК-чувствительности клеток РМЖ. На основании полученных данных мы выделили 4 группы линий по уровню РК-чувствительности: максимально чувствительные (пролиферация снижалась в 2 и более раз при концентрации АТРА до 1 мкМ включительно), средне чувствительные (пролиферация снижалась в 2 и более раз при концентрации АТРА 10 мкМ), средне резистентные (пролиферация снижалась в 2 и более раз при концентрации АТРА 50 мкМ) и максимально резистентные (пролиферация не снижалась в 2 и более раз при концентрации АТРА 50 мкМ).

Для того, чтобы понять механизм рост-ингибирующего действия РК, мы исследовали влияние ATRA на прохождение клеточного цикла и уровень апоптоза в клетках РМЖ. Согласно полученным данным, в РК-чувствительных клетках преимущественно наблюдается G0/G1 арест клеточного цикла и в меньшей степени индукция некроза и апоптоза. В РК-резистентных клетках РК не препятствует, а даже несколько способствует прохождению клеточного цикла. Таким образом, ATRA оказывает на клетки преимущественно не цитотоксическое, а антипролиферативное действие, что согласуется с данными литературы [36].

Анализ экспрессии CRABP1 в рамках данной экспериментальной модели не выявил строгой корреляции между уровнем белка CRABP1 и РК-чувствительностью клеток. Однако важно отметить, что в наиболее устойчивых клетках продукция данного белка отсутствовала, а РК-чувствительные линии оказались CRABP1-позитивными, за исключением единственной линии SKBR3, где продукция CRABP1 также не детектировалась.

Для ответа на вопрос, чем обусловлена столь высокая вариативность продукции белка CRABP1, мы далее исследовали экспрессию гена CRABP1 на уровне мРНК, а также метилирование и деацетилирование гистонов в клетках той же экспериментальной модели. Согласно полученным данным, опубликованным нами в открытых источниках и цитируемых далее [68], в максимально резистентных клетках трижды-негативного РМЖ экспрессия мРНК CRABP1 практически отсутствует, причем она не возрастает при обработке деметилирующим агентом и почти не меняется при ацетилировании гистонов, то есть в этих клетках происходит глубокая репрессия транскрипции. Интересно, что в клетках HBL100 экспрессия мРНК CRABP1 восстанавливается при обработке комбинацией DAC+TSA. Это может означать, что в данной линии клеток в подавлении транскрипции CRABP1 задействованы оба механизма – метилирование гена CRABP1 и деацетилирование гистонов. Но даже и в этом случае продукция белка CRABP1 не восстанавливается. В другой максимально РК-резистентной линии, MDA-MB-231, экспрессия мРНК не восстанавливается даже при сочетании DAC+TSA. Таким образом, в максимально РК-резистентных клетках происходит глубокая и, по-видимому, необратимая репрессия экспрессии мРНК, осуществляемая с помощью нескольких механизмов регуляции на транскрипционном, а также на посттранскрипционном уровнях [68].

В средне РК-резистентных клетках трижды-негативного РМЖ наблюдается исходно высокая экспрессия CRABP1 на уровне мРНК, которая соответствует высокому уровню белковой продукции. Обработка деметилирующим агентом не приводит к увеличению экспрессии, что в сочетании с высоким исходным уровнем мРНК свидетельствует об отсутствии метилирования.

Согласно полученным и опубликованным нами данным [68], в РК-чувствительных клетках регуляция экспрессии CRABP1 различается. Так, в клетках SKBR3 исходно низкий

уровень белка соответствует низкому уровню мРНК, и обе характеристики возрастают в результате деметилирования. Другая максимально РК-чувствительная линия, T47D, демонстрирует относительно высокий уровень экспрессии CRABP1 как на уровне мРНК, так и на уровне белка, в связи с чем, по-видимому, слабо индуцирует экспрессию при обработке деметилирующим агентом. В то же время в обеих средне РК-чувствительных линиях MCF7 и HCC1954 наблюдается иная картина – при высоком уровне белка мРНК детектируется на крайне низком уровне. Такой странный результат может объясняться высоким периодом полужизни белка, что, в свою очередь, может вызываться низким уровнем протеолитической деградации и другими причинами. Например, по данным литературы, белок CRABP1 вследствие особенностей своей структуры подвержен агрегации («Aggregation propensity») – необратимому процессу «складыванию белков в стопку», в ходе которого белок становится неактивным. Агрегация связана с так называемым «открытым состоянием» структуры белка («open state»), обеспечивающим связывание РК, более того, различные мутации способствуют такому фолдингу и увеличивают срок пребывания белка в данной конформации [31, 76, 104, 210]. Данный феномен может лежать в основе регуляции активности данного белка и объяснять высокий уровень «накапливаемого» белка в клетках при низком уровне экспрессии мРНК (обсуждается в статье автора [68]).

В целом результаты анализа экспрессии CRABP1 хорошо соотносятся с гипотетической ролью данного белка в ограничении внутриклеточной активности РК. Как уже говорилось, согласно одной из гипотез, CRABP1, обладающий максимальной аффинностью к РК среди РК-связывающих белков [63], связывает и удерживает РК в цитоплазме, препятствуя ее транспортировке в ядро и передаче ядерным рецепторам (осуществляемой с помощью CRABP2) для реализации транскрипционной активности. На основании полученных данных можно предположить, что РК-чувствительные клетки «используют» различные методы для сохранения в клетке белка CRABP1 (или возможности быстрой индукции его экспрессии). Согласно нашей гипотезе, опухолевым клеткам, чувствительным к действию РК, белок CRABP1 необходим для защиты от рост-ингибирующей опухоль-супрессорной активности РК, и они могут либо экспрессировать его изначально, либо индуцировать экспрессию при увеличении внутриклеточной концентрации РК. Такой гипотетический механизм является достаточно экономичным способом регуляции внутриклеточной активности РК, позволяя «депонировать» РК при ее избытке и использовать – при недостатке или повышении потребности. В то же время полностью РК-резистентным клеткам CRABP1 «не нужен», поскольку им «не страшен» избыток РК в клетке – он не приведет к подавлению их роста (объяснение представлено по статье авторского коллектива [68]).

Эту гипотезу подтверждают и результаты ингибирования метилирования, выявившие восстановление экспрессии CRABP1 в РК-чувствительных клетках и отсутствие эффекта - в РК-резистентных линиях. При этом с CRABP2 ситуация более «классическая» в том смысле, что продукция белка хорошо соотносится с уровнем мРНК и присутствует практически везде, за исключением максимально РК-резистентных линий, где крайне слабо регистрируется на уровне мРНК и практически не детектируется на уровне белка.

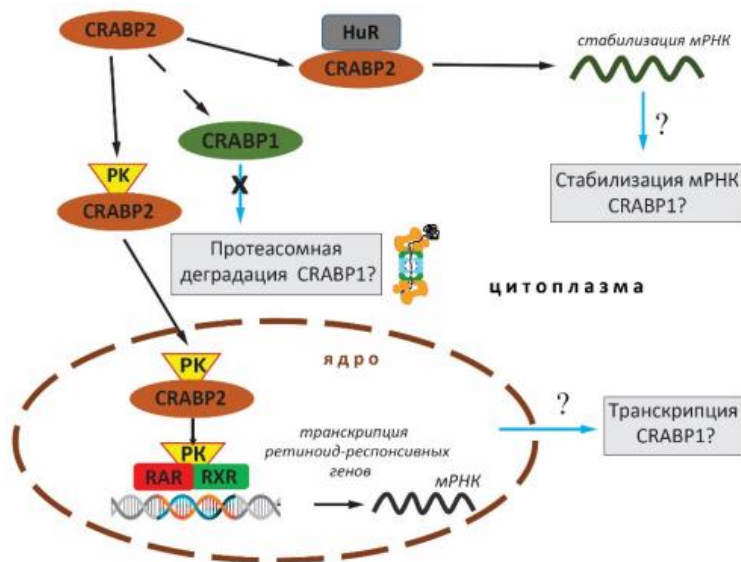
Такие результаты свидетельствуют скорее об изменении экспрессии CRABP1 вследствие изменения РК-чувствительности, и не позволяют сделать обратное заключение, то есть вывод об участии или неучастии данного белка в формировании резистентности. Очевидно, что если такое участие имеет место, то CRABP1 является одним из факторов наряду с другими путями и механизмами приобретения РК-резистентности, которых по имеющимся в литературе данным может быть достаточно много [42]. Также важно напомнить о высокой молекулярной гетерогенности РМЖ, с учетом которой формирование РК-резистентности может реализовываться с помощью различных сценариев [208].

В то же время на клетках РМЖ подтвердилась обнаруженная на других моделях взаимосвязь экспрессии CRABP1 и CRABP2. Более того, мы высказали предположение о наличии регуляторной связи между данными белками, при которой CRABP2 является регулятором CRABP1. Чтобы проверить данное предположение, мы провели нокдаун CRABP2 в клетках РК-чувствительных (MCF7) и РК-резистентных (MDA-MB-453 и MDA-MB-468) линий и обнаружили во всех случаях снижение продукции CRABP1. Таким образом, полученные результаты впервые демонстрируют наличие универсальной (присутствующей в клетках различного происхождения) корреляции между экспрессией CRABP1 и CRABP2 и регуляторной связи, при которой CRABP2 является “upstream”-регулятором продукции CRABP1.

В этом контексте хочется напомнить ранее опубликованные сотрудниками лаборатории данные о корреляции между экспрессией CRABP1 и CRABP2 в тканях НМПЛ. Важно отметить, что в данном исследовании максимальный уровень корреляции наблюдался в опухолях высокой или умеренной степени дифференцировки, тогда как в образцах низкодифференцированных опухолей связь между двумя гомологами как на уровне мРНК, так и белка, отсутствовала [73]. Результаты цитируемой работы подтверждают наличие взаиморегуляции между белками CRABP1 и CRABP2 и свидетельствуют о существовании регуляторного механизма, обеспечивающего, по-видимому, баланс активности РК в клетках, сохраняющих РК-чувствительность, и утрачиваемого в процессе дедифференцировки клеток в ходе опухолевой прогрессии. Как может реализовываться такая регуляция? Можно предположить несколько сценариев CRABP2-зависимой регуляции белка CRABP1 (Рисунок 29).

Гипотетические механизмы далее приводятся в соответствии со статьей авторского коллектива [70].

Первый вариант предполагает прямую регуляцию экспрессии мРНК, когда CRABP2-зависимая доставка РК к ядерным рецепторам приводит к активации транскрипции CRABP1, в промоторе которого имеется РК-респонсивный элемент, что может создавать петлю обратной связи. Помимо трансаактивации транскрипции можно предположить механизм CRABP2-зависимой стабилизации транскриптов CRABP1. Это предположение основано на показанной в нескольких работах активности CRABP2, не связанной с РК и реализуемой с помощью взаимодействия с представителями группы Ну-белков, относящихся к семейству ELAV (от англ. embryonic lethal abnormal vision) РНК-связывающих белков. Основная их функция связана с посттранскрипционной регуляцией экспрессии генов и стабилизацией транскриптов мРНК и некоторых других типов РНК (например, микроРНК) [227]. CRABP2, по-видимому, имеет несколько мишеней из этой группы белков, в частности, белки HuD и HuV [91, 223, 224]. Взаимодействие CRABP2 с Ну-белками приводит к их активации и как результат – к повышению продукции целого ряда регуляторных и сигнальных белков. Интересно, что HuR, в свою очередь, способствует транспортировке CRABP2 в ядро, стимулируя таким образом его активность в отношении доставки РК к ядерным рецепторам (приводится по статье авторов [70]).



Такая регуляция может реализовываться с помощью CRABP2-зависимой активации транскрипции CRABP1, CRABP2-зависимой стабилизации мРНК CRABP1 при участии представителей группы Ну-белков (например, HuR), а также возможной негативной регуляции протеолитической деградации CRABP1. Адаптировано из [70]

Рисунок 29 - Гипотетическая схема CRABP2-зависимой регуляции продукции CRABP1

Можно также предположить, что CRABP2-зависимая регуляция CRABP1 происходит не на уровне транскрипции или стабилизации мРНК, а реализуется на посттранскрипционном уровне. Такая регуляция может осуществляться, например, за счет протеолитической деградации CRABP1, активируемой в отсутствие CRABP2. Механизмы регуляции, реализуемые по этому сценарию, показаны для функционально связанных или родственных белков. Характерным примером могут служить белки флотиллин-1 и флотиллин-2, для которых неоднократно показано, что подавление одного из гомологов приводит к снижению уровня другого [15, 79, 198]. (приводится по статье авторов [70]).

Для ответа на вопрос, на каком уровне реализуется CRABP2 зависимая регуляция CRABP1, мы провели сравнение экспрессии мРНК *CRABP1* в клетках с нокадаун *CRABP2*, которое показало отсутствие CRABP2-зависимых изменений. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что регуляция CRABP1 осуществляется на посттранскрипционном уровне.

В связи с тем, что анализ экспрессии CRABP1 не дал однозначного ответа на вопрос об участии данного белка в РК-резистентности клеток РМЖ (которая, как уже говорилось выше, может быть результатом сочетанного воздействия различных факторов), мы далее провели прямое исследование влияния данного белка на РК-чувствительность клеток. Мы также исследовали влияние CRABP1 на пролиферацию клеток РМЖ в стандартных условиях культивирования, что может характеризовать его участие в опухолевой прогрессии. Параллельно мы исследовали влияние CRABP2 на те же характеристики. Ранее таких исследований не проводилось. Уровни экспрессии и функциональное значение обоих белков CRABP совместно исследовались в единственной работе, данные которой свидетельствуют о конкуренции между двумя гомологами за связь с РК и подавлении белком CRABP1 активности CRABP2 в отношении проведения РК-зависимой сигнализации [125].

Для того, чтобы напрямую оценить функциональное значение каждого из гомологов CRABP в РК-чувствительности/резистентности РМЖ, а также в характеристиках роста клеток, мы далее исследовали влияние направленной модификаций экспрессии генов CRABP1 и CRABP2 на рост клеток в стандартных условиях и их выживание в присутствии ATRA. Для этой задачи мы выбрали по две клеточные линии из групп «РК-чувствительных», «средне-резистентных» и «максимально резистентных» линий. Суммируя полученные данные, можно сделать следующие выводы (приводятся по статье авторов [68]): а) экзогенная экспрессия CRABP1 и CRABP2 не влияет на обе исследуемые характеристики максимально РК-резистентных клеток (напомним, что эндогенная экспрессия обоих гомологов в этих клетках отсутствует); б) во всех остальных линиях CRABP1 и CRABP2 оказывают противонаправленный эффект в отношении обеих характеристик (сами характеристики

меняются сонаправленно); в) направление этого влияния является противоположным в РК-чувствительных и РК-резистентных клетках.

Полученные результаты представляются достаточно неожиданными, однако в действительности они хорошо укладываются в концепцию, о которой говорилось выше. Кроме того, они объясняют имеющиеся в литературе противоречивые данные о роли белков CRABP в опухолевой прогрессии (приводятся по статье авторов [68]). Так, с одной стороны, целый ряд данных свидетельствует об участии CRABP2 в негативной регуляции опухолевой прогрессии, в связи с чем данный белок считается опухолевым супрессором [62, 223, 224]. С другой стороны есть множество примеров противоположного функционального значения CRABP2 в опухолевой прогрессии. Например, в клетках глиомы [126], трижды-негативного РМЖ [74], а также в клетках нейробластомы [91], его экспрессия коррелирует с агрессивностью опухолей и способствует малигнизации клеток. Как уже говорилось, роль CRABP1 исследовалась существенно меньше. Согласно нашим данным, а также некоторым данным литературн, он оказывает опухоль-промоторное влияние на трансформированные мезенхимальные клетки [111], клетки нейроэндокринных опухолей поджелудочной железы [2] и клетки НМРЛ [131]. Вместе с тем, в клетках нейробластомы (наиболее РК-чувствительном типе опухолей) согласно нашим данным экспрессия CRABP1 коррелирует с высокой степенью дифференцировки [3], которая, в свою очередь, связана с благоприятным прогнозом. Есть и ряд других данных, свидетельствующих в пользу опухоль-супрессорной роли CRABP1 [8, 35]. Эти, на первый взгляд, противоречивые данные во многом связаны с тем, что в подавляющем большинстве работ проводилось исследование одного из белков CRABP, в то время как совместное «поведение» двух гомологов почти не исследовалось. Основным исключением является упомянутая выше работа Liu R.-Z и соавторов [125], в которой впервые было сделано предположение о противоположной функции белков CRABP1 и CRABP2 в прогрессии РМЖ. Результаты данной работы хорошо укладываются в такую гипотезу, впрямую подтверждая такое предположение для каждого из гомологов в случае РК-чувствительных клеток. (приводятся по статье авторов [68]).

Однако как может объясняться тот факт, что в РК-резистентных клетках при сохранении противоположной роли белков CRABP1 и CRABP2 направленность этой роли (то есть функциональное значение каждого из гомологов) меняется на обратное? Здесь нужно вспомнить общее представление об устройстве ретиноевого сигналинга и РК-связывающих белках. Транспорт РК в ядро и ее защиту в цитоплазме способны осуществлять несколько белков, относящихся к семейству iLBP - прежде всего CRABP1 и CRABP2, а также FABP5. Напомним, что среди всех РК-связывающих белков CRABP1 имеет наибольшую аффинность к РК. Также необходимо отметить (далее в соответствии со статье авторов [68]), что согласно

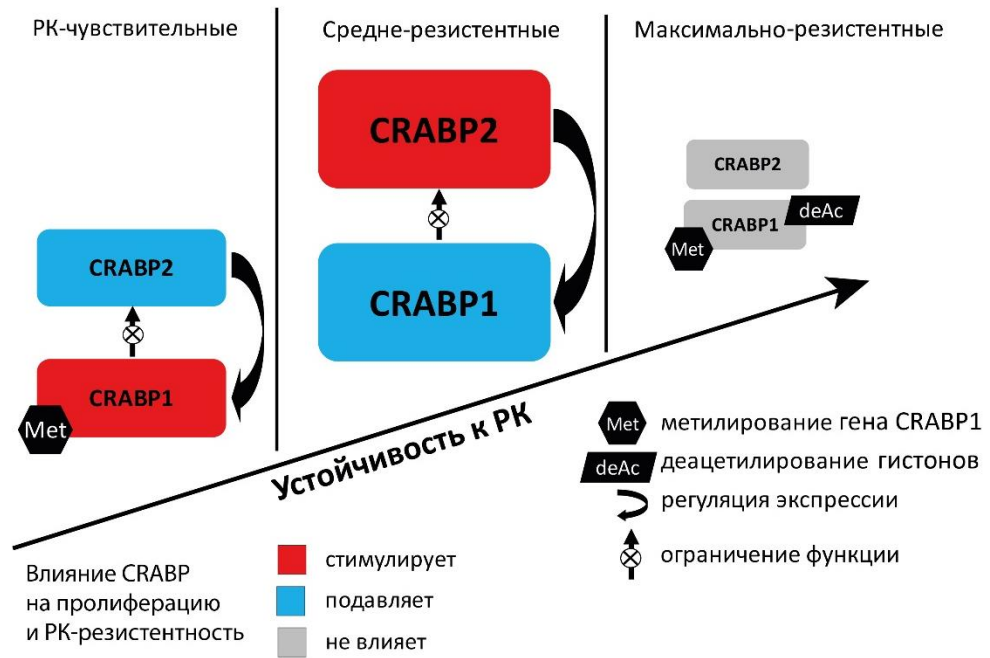
некоторым данным, разные РК-связывающие белки направляют РК к разным ее ядерным рецепторам. Так, CRABP2 передает РК преимущественно рецепторам RAR, прежде всего RAR α , в то время как FABP5 преимущественно доставляет РК рецепторам PPAR, прежде всего PPAR δ [191]. Более того, предполагается, что передача РК по пути CRABP2/ RAR α приводит к РК-зависимой активации транскрипции ретиноид-респонсивных генов с про-дифференцировочной, про-апоптотической и анти-пролиферативной активностью, в то время как активация каскада РК-FABP5-PPAR δ оказывает противоположный эффект [122, 154]. В связи с тем, что устройство ретиноевого сигнала до сих пор исследовано недостаточно, остается непонятным, насколько это универсальная закономерность, и способны ли указанные РК-связывающие белки передавать РК «чужим» рецепторам (например, CRABP2 рецепторам PPAR). Также непонятно, от чего зависит то, какой именно путь доминирует в клетках. Авторы приведенной гипотезы предполагают, что это обусловлено соотношением уровней экспрессии РК-связывающих белков и соотношением экспрессии ядерных рецепторов РК [191]. При этом важно отметить, что гены, кодирующие все перечисленные белки, сами, в свою очередь, являются РК-респонсивными, что создает петли обратной связи и позволяет клеткам менять соотношение экспрессии различных участников ретиноевого сигналинга в зависимости от содержания РК.

Возвращаясь к результатам данной работы, можно предположить, (в соответствии со статьей авторов [68]), что смена функциональной роли CRABP2 в РК-резистентных клетках связана с изменением РК-зависимого сигналинга, при котором активность данного белка приводит к активации транскрипции опухоль-промотирующих (анти-апоптотических, пролиферативных) генов. Это, в свою очередь, может быть вызвано изменением соотношения ядерных рецепторов РК.

Другой причиной различной функциональной роли белка CRABP2 в РК-резистентных и РК-чувствительных линиях клеток может быть разница их гормонального статуса. Так, MCF7 является ER-позитивной, а SKBR3 – HER2-нео позитивной линией, в то время как HCC1937 и MDA-MB-468 являются линиями трижды-негативного РМЖ. Можно предположить, что данный белок оказывает опухоль-промотирующее влияние на клетки трижды-негативного подтипа РМЖ. Различное влияние CRABP2 на клетки РМЖ с разным гормональным статусом было показано в одной из работ [74]. Вместе с тем в двух других линиях трижды-негативного РМЖ MDA-MB-231 и HBL100, являющиеся максимально РК-резистентными, экзогенная экспрессия белков CRABP не оказала влияния на пролиферативную активность и РК-чувствительность клеток. Однако эти линии характеризуются полной репрессией белков CRABP, в отличие от клеток HCC1937 и MDA-MB-468, в которых экспрессия обоих гомологов представлена на максимальном уровне, а метилирование отсутствует.

Что же касается CRABP1, (далее в соответствии со статьей авторов [68]), то его роль по сути, не меняется и является, по-видимому, «вторичной» по отношению к CRABP2: ограничение активности РК за счет удерживания ее в цитоплазме и функциональное «противодействие» CRABP2. Соответственно, в РК-чувствительных клетках, CRABP1 препятствует опухоль-супрессорной активности CRABP2 и снижает чувствительность к CRABP2-опосредуемой транскрипционной активности РК, а в более резистентных клетках, в которых CRABP2 выполняет роль опухолевого промотора, CRABP1 становится «супрессором». При этом максимальная РК-резистентность сопровождается полной репрессией ретиноевого сигналинга (либо реализуется за счет других РК-связывающих белков), а экзогенная экспрессия каждого из белков не вызывает изменений исследуемых характеристик. Примечательно, что репрессируется экспрессия обоих белков. Более того, утрачивается и CRABP2-зависимая регуляция экспрессии CRABP1, наличие которой показано нами как для РК-чувствительных, так и для средне-резистентных линий. Это подтверждается отсутствием индукции экспрессии CRABP1 при гиперэкспрессии CRABP2. Полученные результаты хорошо согласуются с данными об утрате в низкодифференцированных образцах НМРЛ корреляции между экспрессией CRABP1 и CRABP2 [73].

Гипотетическая модель участия белков CRABP в опухолевой прогрессии и их связи с РК-чувствительностью, основанная на полученных результатах, представлена на рисунке 30.



Цветными фигурами обозначены белки CRABP1 и CRABP2, размер отражает изменение уровня экспрессии. Цвет обозначает роль в пролиферации и РК-резистентности клеток. Стрелками указаны регуляция экспрессии и функциональное влияние. Рисунок и подписи приведены в авторском варианте [68]. Пояснения в тексте

Рисунок 30 - Гипотетическая модель связи экспрессии CRABP1 и CRABP2 с опухолевой прогрессией и РК-резистентностью

Согласно данной модели, в РК-чувствительных ER/HER2(+) клетках РМЖ CRABP2 обладает опухоль-супрессорной, а CRABP1 – опухоль-промоторной активностью, при этом белки связаны между собой на уровне экспрессии (CRABP2 активирует CRABP1); функционально CRABP1 препятствует CRABP2 в проведении РК-сигналинга, предположительно, за счет секвестрирования РК в цитоплазме. При этом CRABP1 характеризуется тем или иным уровнем метилирования промотора, что может означать «готовность» РК-чувствительных клеток к защите от РК в случае ее избытка. В средне РК-резистентных клетках трижды-негативного РМЖ функциональное значение белков CRABP меняется на противоположное: CRABP2 обладает опухоль-промоторной, а CRABP1 – опухоль супрессорной активностью, при этом сохраняется CRABP2-зависимая регуляция экспрессии CRABP1 (см. [70]) и противоположная роль гомологов в проведении РК-сигналинга. Экспрессия на уровне мРНК CRABP2 и CRABP1 максимальная, метилирование CRABP1 минимально. В максимально РК-резистентных клетках трижды-негативного РМЖ продукция белков CRABP не детектируется, транскрипция CRABP1 репрессируется на нескольких

уровнях. Взаимосвязь экспрессии белков CRABP и их функциональное значение в опухолевой прогрессии и РК-чувствительности утрачиваются (объяснение приведено в авторской редакции [68]).

В соответствии с такой концепцией, в клетках, сохраняющих РК-чувствительность, чем более высокий уровень РК они способны «выносить», тем больший уровень CRABP1 им нужен для защиты. Поэтому в РК-чувствительных клетках он либо изначально присутствует в некотором количестве, либо может оперативно индуцировать экспрессию при повышении концентрации РК с помощью деметилирования, а в более РК-резистентных клетках CRABP1 полностью деметилирован и работает «максимально».

Как уже говорилось (далее в авторской редакции [71]), результаты исследований свидетельствуют о том, что РК-связывающие белки проявляют избирательность при доставке РК к специфическим рецепторам. Это, по всей видимости, приводит к активации транскрипции различных генов и может даже оказывать противоположное воздействие на рост и выживаемость клеток [191]. Следовательно, ядерные рецепторы RAR потенциально являются одними из факторов, определяющих чувствительность клеток к РК. В ходе настоящей работы было проведено сравнение экспрессии RAR α в клетках РМЖ, чувствительных и резистентных к РК. Результаты выявили значимое снижение уровня мРНК данного гена в клетках, чувствительных к РК. Кроме того, обнаружено, что уменьшение экспрессии RAR α происходит параллельно со снижением РК-чувствительности в исследуемых клеточных линиях. Таким образом, выявлена корреляция между экспрессией RAR α и чувствительностью клеток РМЖ к РК. Полученные результаты согласуются с данными исследования, проведенного на клетках РМЖ с различным гормон-рецепторным статусом. В этой работе показано, что подавление RAR α вызывало снижение РК-чувствительности клеток SKBR3. Кроме того, авторы продемонстрировали коамплификацию RAR α с рецептором ERBB2, что указывает на связь РК-чувствительности с экспрессией как RAR α , так и эстрогеновых рецепторов [160]. Исследования на клетках нейробластомы, одного из наиболее чувствительных к терапии РК типов солидных опухолей, показали, что про-апоптотическая функция РК связана с протеосомной деградацией RAR α . При этом гиперэкспрессия RAR α в клетках нейробластомы приводит к повышению их чувствительности к РК [147]. Таким образом, полученные данные хорошо согласуются с данными литературы и свидетельствуют о том, что снижение экспрессии RAR α является одним из механизмов формирования РК-резистентности.

Ситуация с ядерным рецептором RAR β более сложная. В нашей работе экспрессия мРНК RAR β в клетках РМЖ коррелировала с РК-резистентностью. Так, в РК-чувствительных клетках уровень экспрессии RAR β был минимальным, а в максимально РК-резистентных RAR β экспрессировался на максимальном уровне. Таким образом, можно предположить, что ядерные

рецепторы RAR α и RAR β играют противоположную роль в процессе РК-резистентности клеток РМЖ. Однако, некоторые литературные данные демонстрируют прямую связь между экспрессией RAR β и RAR α , причем последний регулирует экспрессию первого [49]. В целом информации об этом рецепторе существенно меньше, что объясняется, по-видимому, тем, что во многих опухолях RAR β метилирован, и снижение его экспрессии коррелирует со злокачественностью заболевания [78, 127, 183, 207]. Такие же данные известны и для РМЖ [54, 172]. Однако в большинстве этих работ RAR β подробно не изучался.

В связи с этим, особый интерес представляет пул работ по изучению роли различных изоформ RAR β , соотношение экспрессии которых существенно влияет на ответ на РК. Например, показано, что в клетках РМЖ практически отсутствует экспрессия RAR β 2, что связано прежде всего не со специфическими мутациями данного гена, а с гиперметилованием промотора P2 [196, 197]. Повышение экспрессии с помощью трансдукции или активация данного белка ретиноидами приводили к повышению РК-чувствительности клеток, что выражалось в снижении пролиферации и метастатического потенциала, а также повышении количества апоптотических клеток при обработке РК [192, 214]. Другая изоформа - RAR β 4 - является продуктом альтернативного сплайсинга RAR β 2 [149]. В целом считается, что обе изоформы, RAR β 2 и RAR β 4, обладают одинаковыми функциями в отношении РК-резистентности [39, 203]. Однако некоторые данные свидетельствуют о разной роли данных изоформ. Так, в одной из работ показано, что повышение экспрессии RAR β 4 на фоне снижения RAR β 2 приводило к приобретению клетками резистентности к ретиноидам, в то время как клетки, экспрессирующие только RAR β 2, оказались более чувствительными к действию ретиноидов [94]. Считается, что RAR β 5 транскрибируется с другого промотора P3, не имеющего последовательности RARE. Продукт данной изоформы экспрессируется в некоторых линиях РМЖ и негативно регулирует РК-зависимую транскрипцию генов [39]. В литературе также имеются немногочисленные исследования участия RAR β 5 изоформы в РК-резистентности [44, 164]. В одной из работ показана прямая связь между экспрессией RAR β 5 и РК-резистентностью. Авторы показывают, что ER-негативные опухоли и клетки нормального эпителия, которые являются РК-резистентными, обладают высокой экспрессией RAR β 5, в то время как в ER-позитивных опухолях, считающихся РК-чувствительными, данная изоформа отсутствует [165]. В большинстве работ, посвященных метилированию RAR β , авторы не уточняют, какая именно изоформа метилирована [64, 230, 232]. Это очень важно, ведь по данным литературы экспрессия разных изоформ может вносить существенный вклад в РК-резистентность. В недавних работах показано, что, по-видимому, чаще всего происходит метилирование именно RAR β 2. Интересно, что эпигенетическое молчание этой изоформы часто случается при РМЖ и коррелирует с опухолевой прогрессией [239, 242]. В данной работе при

исследовании уровня мРНК *RAR β* мы также использовали универсальные пары праймеров, отжигающиеся на всех изоформах. В связи с полученными результатами и новыми литературными данными в дальнейшем представляется важным исследовать экспрессию каждой изоформы по отдельности. Таким образом, учитывая представленные данные об изоформах *RAR β* можно предположить, что показанное нами увеличение уровня экспрессии *RAR β* по мере усиления РК-резистентности клеток происходит за счет изменения соотношения изоформ *RAR*, при котором преобладает *RAR β 5*, а *RAR β 2* подавляется.

Еще одним фактором, задействованным в приобретении устойчивости клеток к РК, может быть система ее катаболизма. Основными ферментами, окисляющими РК, как уже говорилось, являются цитохромы *CYP26*, относящиеся к семейству P450. С учетом того, что активация катаболизма РК может способствовать развитию резистентности, ранее были предприняты попытки усиления терапевтического действия РК соединениями, блокирующими метаболизм РК (RAMBA) [59, 152]. Однако данный подход не привел к преодолению РК-резистентности, вероятно вследствие крайне сложного устройства системы регуляции ретиноевого сигналинга и транскрипции ретиноид-респонсивных генов, к которым относятся и сами цитохромы *CYP26*, что создает регуляторные петли прямой и обратной связи. Важно отметить, что на РК-чувствительность/резистентность могут одновременно оказывать влияние разные участники ретиноевой сигнализации, в том числе *CRABP1* параллельно с белками *CYP26* и другими факторами, о чем свидетельствует, в частности, увеличение уровня цитохрома *CYP26A1* в ответ на высокие дозы РК при подавлении *CRABP1* [206].

При анализе экспрессии *CYP26A1* и *CYP26B1* в клетках РМЖ в стандартных условиях культивации мы не обнаружили корреляции с РК-чувствительностью клеток. Можно отметить, что уровень мРНК *CYP26B1* практически во всех случаях был выше уровня *CYP26A1*. Инкубация с АТРА приводила к усилению экспрессии обоих цитохромов, однако уровень РК-зависимой индукции был значимо выше в РК-чувствительных клетках. Этот эффект был максимально выражен для *CYP26A1*. То, что *CYP26B1* продемонстрировал активацию экспрессии в меньшей степени, чем *CYP26A1*, связано, по-видимому, с более высоким базальным уровнем мРНК *CYP26B1*. То, что РК-чувствительные клетки продемонстрировали больший уровень индукции *CYP26*, было достаточно неожиданным результатом - можно было ожидать, что в резистентных клетках катаболизм РК будет, наоборот, выше, что означало бы, что способность деградировать РК является фактором, способствующим РК-резистентности. Полученные же результаты указывают на то, что РК-резистентные клетки скорее утрачивают или снижают способность катаболизировать РК. Однако эти данные хорошо согласуются с результатами достаточно давно опубликованной работы, которая была выполнена также на клетках РМЖ и показала, что индукция метаболизма РК происходит именно в РК-

чувствительных клетках [121] (обсуждение результата приведено в авторской редакции статьи [71]).

Согласно нашей гипотезе (приводится в авторской редакции статьи [68]), по мере приобретения РК-резистентного фенотипа утрачивается внутриклеточный баланс РК. Так, мы предполагаем, что в РК-чувствительных клетках происходит достаточно активный синтез РК из предшественников благодаря активности ферментов метаболизма ретинола и ретиналя. Это более нормальное состояние клеток, при котором факторы синтеза и катаболизма РК сбалансированы – клетки синтезируют РК, проводят РК-зависимую сигнализацию и в то же время способны быстро удалить РК в случае ее избытка с помощью активации экспрессии CYP26. РК-резистентные клетки ограничивают проведение ретиноевого сигналинга с помощью показанного нами снижения экспрессии рецепторов $RAR\alpha$, репрессии белков CRABP, а также видимо других механизмов, среди которых, вероятно, и нарушение синтеза РК. Такие клетки «не ожидают» присутствия высокой концентрации РК, и даже если концентрация РК искусственно повышается, она им «не опасна», то есть РК не приводит, как мы видим, к снижению пролиферации, как это имеет место в случае РК-чувствительных клеток. Поэтому в РК-резистентных клетках снижена эффективность системы катаболизма РК, что выражается в уменьшении индукции экспрессии CYP26 в ответ на искусственное увеличение концентрации РК. Проверка этой гипотезы требует дальнейших исследований, которые будут способствовать пониманию механизмов формирования РК-резистентности и повышению эффективности терапии злокачественных солидных опухолей на основе натуральных и синтетических ретиноидов.

Полученные данные свидетельствуют об участии ядерных рецепторов РК, $RAR\alpha$ и $RAR\beta$, а также РК-зависимой индукции цитохромов $CYP26A1$ и $CYP26B1$, в регуляции РК-чувствительности/резистентности клеток РМЖ.

Одним из потенциальных механизмов развития РК-резистентности и малигнизации считается «неканоническая» активность РК, которая заключается в нетранскрипционной активации ключевых белков сигнальных путей. Такая активность РК показана для протеинкиназ АКТ, ERK1/2, p38MAPK и заключается в РК-зависимой краткосрочной (5–60 мин инкубации) стимуляции фосфорилирования данных киназ. Согласно некоторым литературным данным, неканоническая активность РК реализуется с помощью белка CRABP1. Так, Persaud с коллегами выявили участие белка CRABP в реализации «негеномной» активности РК. Согласно данным этой работы, полученным на эмбриональных стволовых клетках, белок CRABP1 участвует в процессе RAR-независимой активации ERK1/2 под воздействием РК в цитоплазме [168]. В более поздней статье был показан еще один механизм, с помощью которого CRABP1-зависимая краткосрочная активация ERK1/2 стимулирует апоптоз.

Согласно результатам данной работы, такая активация стимулирует фосфатазу PP2A, что приводит к дефосфорилированию белка p27 и в итоге - к стимуляции апоптоза или задержке клеточного цикла в G1 фазе [169].

Мы обнаружили ATRA-зависимую краткосрочную активацию протеинкиназ ERK1/2 и АКТ, являющихся ключевыми регуляторами опухолевой прогрессии. Данный эффект соответствует неканонической активности РК и не связан с РК-чувствительностью /резистентностью опухолей, поскольку выявляется как в РК-чувствительных (нейробластомы), так и РК-резистентных клетках (НМРЛ, РМЖ). Таким образом, нетранскрипционная РК-зависимая активация данных протеинкиназ носит универсальный характер. Мы также показали, что реализация неканонической активности РК не требует участия белка CRABP1, поскольку обнаруживается в том числе в клетках с отсутствием экспрессии данного белка. Обнаруженные различия в кинетике РК-зависимого фосфорилирования ERK1/2 и АКТ свидетельствуют о том, что активация данных протеинкиназ реализуется с помощью различных механизмов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эффективность терапии солидных злокачественных опухолей с использованием природных и синтетических ретиноидов ограничивается быстрым формированием малигнизированными клетками резистентности к ретиноевой кислоте. Механизмы РК-резистентности остаются на сегодняшний день не до конца понятны, и их исследование является важной фундаментальной и прикладной задачей экспериментальной онкологии.

В данной работе с использованием нескольких экспериментальных моделей впервые проведено комплексное исследование РК-чувствительности клеток, механизмов и факторов, связанных с развитием РК-резистентности. Особое внимание уделено белкам, связывающих ретиноевую кислоту, CRABP1 и CRABP2, их роли в малигнизации клеток и чувствительности к РК. Впервые показано, что их продукция коррелирует в клетках опухолей различных нозологических типов и определяется взаиморегуляцией, при которой CRABP2 является регулятором CRABP1.

С использованием широкой панели клеточных линий рака молочной железы обнаружено, что гомологи CRABP1 и CRABP2 оказывают противоположное влияние на рост и РК-чувствительность клеток, а направление этого влияния зависит от исходного уровня РК-чувствительности. Максимально устойчивые к РК клетки трижды негативного РМЖ характеризуются глубокой репрессией обоих гомологов CRABP, реализуемой на нескольких уровнях эпигенетической регуляции.

К другим факторам, определяющим чувствительность/резистентность к РК, по данным работы можно отнести экспрессию ядерных рецепторов *RAR α* и *RAR β* и их соотношение, а также способность клеток индуцировать экспрессию *CYP26A1* и *CYP26B1* в ответ на ретиноевую кислоту.

Полученные данные имеют важное фундаментальное значение в отношении понимания механизмов внутриклеточной ретиноевой сигнализации и практический потенциал для разработки новой стратегии и подходов к терапии солидных злокачественных новообразований на основе ретиноидов.

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 показана корреляция между продукцией белков CRABP1 и CRABP2 в клетках опухолей различного гистогенеза, а также наличие 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 клетках 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 индукции экспрессии 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 НМРЛ и нейробластомы. Показано, что данный эффект не зависит от РК-чувствительности и экспрессии CRABP1.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ЗНО – злокачественные новообразования

НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого

ОПЛ – острый промиелоцитарный лейкоз

ОТ-ПЦР РВ – обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция в реальном времени

РК – ретиноевая кислота

РМЖ – рак молочной железы

АКТ - RAC-alpha serine/threonine-protein kinase

АТРА – all-trans retinoic acid, полностью транс-ретиноевая кислота

CRABP1 – cellular retinoic acid binding protein 1

CRABP2 – cellular retinoic acid binding protein 2

CYP26A1 - cytochrome P450 family 26 subfamily A member 1

CYP26B1 - cytochrome P450 family 26 subfamily B member 1

ДАС - 5-aza-2'-deoxycytidine, децитабин

DMSO – dimethyl sulfoxide, диметилсульфоксид (ДМСО)

ER α – estrogen receptor alpha

ERK1/2 - extracellular signal-regulated kinase 1/2

FABP5 – fatty acid binding protein 5

НАТ - histone acetyltransferase

HDAC - histone deacetylase

HER2 - human epidermal growth factor receptor 2

PPARD - peroxisome proliferator-activated receptor delta

RAR α – retinoic acid receptor alpha

RAR β - retinoic acid receptor beta

RARE - retinoic acid response element

RPL27 - 60S ribosomal protein L27

TSA – trichostatin A, трихостатин А

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.
2. Делекторская, В.В. Экспрессия белка, связывающего ретиноевую кислоту, и пролиферативная активность клеток в нейроэндокринных опухолях поджелудочной железы / В.В. Делекторская, Г.Ю. Чемерис, Я.А. Каинов, Н.А. Козлов, И.Б. Зборовская // Молекулярная медицина. – 2013. – Т.1.
3. Строганова, А.М. Белок CRABP1 и его роль в процессе дифференцировки нейробластомы / А.М. Строганова, Г.Ю. Чемерис, Е.М. Чевкина, А.И. Сендерович, А.И. Карселадзе // Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина МЗ РФ. – 2016. – Т.27. – №2. – С.157-164.
4. Чевкина, Е.М. Белки CRABP-родственники или однофамильцы? / Е.М. Чевкина, И.А. Фаворская // Успехи молекулярной онкологии. – 2015. – №2.
5. Abu-Abed, S.S. Mouse P450RAI (CYP26) expression and retinoic acid-inducible retinoic acid metabolism in F9 cells are regulated by retinoic acid receptor γ and retinoid X receptor α / S.S. Abu-Abed, B.R. Beckett, H. Chiba, J. V. Chithalen, G. Jones, D. Metzger, P. Chambon, M. Petkovich // Journal of Biological Chemistry. – 1998. – Vol.273. – №4. – P.2409-2415.
6. Afonja, O. Induction of PDCD4 tumor suppressor gene expression by RAR agonists, antiestrogen and HER-2/neu antagonist in breast cancer cells. Evidence for a role in apoptosis / O. Afonja, D. Juste, S. Das, S. Matsushashi, H.H. Samuels // Oncogene. – 2004. – Vol.23. – №49. – P.8135-8145.
7. Afonja, O. RAR agonists stimulate SOX9 gene expression in breast cancer cell lines: Evidence for a role in retinoid-mediated growth inhibition / O. Afonja, B.M. Raaka, A. Huang, S. Das, X. Zhao, E. Helmer, D. Juste, H.H. Samuels // Oncogene. – 2002. – Vol.21. – №51. – P.7850-7860.
8. Ahlquist, T. Gene methylation profiles of normal mucosa, and benign and malignant colorectal tumors identify early onset markers / T. Ahlquist, G.E. Lind, V.L. Costa, G.I. Meling, M. Vatn, G.S. Hoff, T.O. Rognum, R.I. Skotheim, E. Thiis-Evensen, R.A. Lothe // Molecular Cancer. – 2008. – Vol.7. – P.94.
9. Alsafadi, S. Retinoic acid receptor alpha amplifications and retinoic acid sensitivity in breast cancers / S. Alsafadi, C. Even, C. Falet, A. Goubar, F. Commo, V. Scott, V. Quidville, L. Albiges, M.V. Dieci, J. Guegan, V. Lazar, J.C. Ahomadegbe, S. Delalogue, F. André // Clinical Breast Cancer. – 2013. – Vol.13. – №5. – P.401-408.
10. Alsayed, Y. Activation of Rac1 and the p38 Mitogen-activated Protein Kinase Pathway in

Response to All-trans-retinoic Acid / Y. Alsayed, S. Uddin, N. Mahmud, F. Lekmine, D. V. Kalvakolanu, S. Minucci, G. Bokoch, L.C. Platanius // *Journal of Biological Chemistry*. – 2001. – Vol.276. – №6. – P.4012-4019.

11. Altucci, L. The promise of retinoids to fight against cancer / L. Altucci, H. Gronemeyer // *Nature Reviews Cancer*. – 2001. – Vol.1. – №3. – P.181-193.

12. Altucci, L. Retinoic acid-induced apoptosis in leukemia cells is mediated by paracrine action of tumor-selective death ligand TRAIL / L. Altucci, A. Rossin, W. Raffelsberger, A. Reitmair, C. Chomienne, H. Gronemeyer // *Nature Medicine*. – 2001. – Vol.7. – №6. – P.680-686.

13. Alvarez, S. Structure, function and modulation of retinoic acid receptor beta, a tumor suppressor / S. Alvarez, P. Germain, R. Alvarez, F. Rodríguez-Barrios, H. Gronemeyer, A.R. de Lera // *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. – 2007. – Vol.39. – №7-8. – P.1406-1415.

14. Aranda, A. Nuclear hormone receptors and gene expression / A. Aranda, A. Pascual // *Physiological Reviews*. – 2001. – Vol.81. – №3. – P.1269-1304.

15. Babuke, T. Hetero-oligomerization of reggie-1/flotillin-2 and reggie-2/flotillin-1 is required for their endocytosis / T. Babuke, M. Ruonala, M. Meister, M. Amaddii, C. Genzler, A. Esposito, R. Tikkanen // *Cellular Signalling*. – 2009. – Vol.21. – №8. – P.1287-1297.

16. Banz, C. The molecular signature of endometriosis-associated endometrioid ovarian cancer differs significantly from endometriosis-independent endometrioid ovarian cancer / C. Banz, U. Ungethuem, R.J. Kuban, K. Diedrich, E. Lengyel, D. Hornung // *Fertility and Sterility*. – 2010. – Vol.94. – №4. – P.1212-1217.

17. Bessone, M.I.D. Protein Kinase C Alpha (PKC α) overexpression leads to a better response to retinoid acid therapy through Retinoic Acid Receptor Beta (RAR β) activation in mammary cancer cells / M.I.D. Bessone, D.E. Berardi, S.M. Cirigliano, D.I. Delbart, M.G. Peters, L.B. Todaro, A.J. Urtreger // *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. – 2020. – Vol.146. – №12. – P.3241-3253.

18. Blaese, M.A. CRABP I expression and the mediation of the sensitivity of human tumour cells to retinoic acid and irradiation / M.A. Blaese, L. Santo-Hoeltje, H.P. Rodemann // *International Journal of Radiation Biology*. – 2003. – Vol.79. – №12. – P.981-991.

19. Bogos, K. Role of retinoic receptors in lung carcinogenesis / K. Bogos, F. Renyi-Vamos, G. Kovacs, J. Tovari, B. Dome // *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. – 2008. – Vol.27. – №1.

20. Bolis, M. Network-guided modeling allows tumor-type independent prediction of sensitivity to all-trans-retinoic acid / M. Bolis, E. Garattini, G. Paroni, A. Zanetti, M. Kurosaki, T. Castrignanò, S.K. Garattini, F. Biancardi, M.M. Barzago, M. Gianni', M. Terao, L. Pattini, M. Fratelli // *Annals of Oncology*. – 2017. – Vol.28. – №3. – P.611-621.

21. Bouras, E. Gene promoter methylation and cancer: An umbrella review / E. Bouras, M. Karakioulaki, K.I. Bougioukas, M. Aivaliotis, G. Tzimagiorgis, M. Chourdakis // *Gene*. – 2019. – Vol.710. – P.333-340.
22. Bouriez, D. Efficiency of all-trans retinoic acid on gastric cancer: A narrative literature review / D. Bouriez, J. Giraud, C. Gronnier, C. Varon // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2018. – Vol.19. – №11.
23. Boylan, J.F. Overexpression of the cellular retinoic acid binding protein-I (CRABP-I) results in a reduction in differentiation-specific gene expression in F9 teratocarcinoma cells / J.F. Boylan, L.J. Gudas // *Journal of Cell Biology*. – 1991. – Vol.112. – №5. – P.965-979.
24. Boylan, J.F. The level of CRABP-I expression influences the amounts and types of all-trans-retinoic acid metabolites in F9 teratocarcinoma stem cells / J.F. Boylan, L.J. Gudas // *Journal of Biological Chemistry*. – 1992. – Vol.267. – №30. – P.21486-21491.
25. Braakhuis, B.J.M. Retinoid metabolism and all-trans retinoic acid-induced growth inhibition in head and neck squamous cell carcinoma cell lines / B.J.M. Braakhuis, I. Klaassen, B.M. Van Der Leede, J. Cloos, R.H. Brakenhoff, M.P. Copper, T. Teerlink, H.F.J. Hendriks, P.T. Van Der Saag, G.B. Snow // *British Journal of Cancer*. – 1997. – Vol.76. – №2. – P.189-197.
26. Breitman, T.R. Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid / T.R. Breitman, S.E. Selonick, S.J. Collins // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1980. – Vol.77. – №5 I. – P.2936-2940.
27. Brigger, D. Activation of RAR α induces autophagy in SKBR3 breast cancer cells and depletion of key autophagy genes enhances ATRA toxicity / D. Brigger, A.M. Schläfli, E. Garattini, M.P. Tschan // *Cell Death and Disease*. – 2015. – Vol.6. – №8. – P.e1861.
28. Bruck, N. A coordinated phosphorylation cascade initiated by p38MAPK/MSK1 directs RAR α to target promoters / N. Bruck, D. Vitoux, C. Ferry, V. Duong, A. Bauer, H. De Thé, C. Rochette-Egly // *EMBO Journal*. – 2009. – Vol.28. – №1. – P.34-47.
29. Budhu, A. Localization of the RAR interaction domain of cellular retinoic acid binding protein-II / A. Budhu, R. Gillilan, N. Noy // *Journal of Molecular Biology*. – 2001. – Vol.305. – №4. – P.939-949.
30. Budhu, A.S. Direct Channeling of Retinoic Acid between Cellular Retinoic Acid-Binding Protein II and Retinoic Acid Receptor Sensitizes Mammary Carcinoma Cells to Retinoic Acid-Induced Growth Arrest / A.S. Budhu, N. Noy // *Molecular and Cellular Biology*. – 2002. – Vol.22. – №8. – P.2632-2641.
31. Budyak, I.L. Early folding events protect aggregation-prone regions of a β -Rich protein / I.L. Budyak, B. Krishnan, A.M. Marcelino-Cruz, M.C. Ferrolino, A. Zhuravleva, L.M. Gierasch // *Structure*. – 2013. – Vol.21. – №3. – P.476-485.

32. Bushue, N. Retinoid pathway and cancer therapeutics / N. Bushue, Y.J.Y. Wan // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2010. – Vol.62. – №13. – P.1285-1298.
33. Campos, B. Retinoid resistance and multifaceted impairment of retinoic acid synthesis in glioblastoma / B. Campos, S. Weisang, F. Osswald, R. Ali, G. Sedlmeier, J. Bageritz, J.P. Mallm, C. Hartmann, A. von Deimling, O. Popanda, V. Goidts, C. Plass, A. Unterberg, P. Schmezer, J. Burhenne, C. Herold-Mende // *Glia*. – 2015. – Vol.63. – №10. – P.1850-1859.
34. Caselli, E. Retinoic acid analogues inhibit human herpesvirus 8 replication / E. Caselli, M. Galvan, F. Santoni, S. Alvarez, A.R. De Lera, D. Ivanova, H. Gronemeyer, A. Caruso, M. Guidoboni, E. Cassai, R. Dolcetti, D. Di Luca // *Antiviral Therapy*. – 2008. – Vol.13. – №2. – P.199-209.
35. Celestino, R. CRABP1, C1QL1 and LCN2 are biomarkers of differentiated thyroid carcinoma, and predict extrathyroidal extension / R. Celestino, T. Nome, A. Pestana, A.M. Hoff, A.P. Gonçalves, L. Pereira, B. Cavadas, C. Eloy, T. Bjørø, M. Sobrinho-Simões, R.I. Skotheim, P. Soares // *BMC Cancer*. – 2018. – Vol.18. – №1. – P.68.
36. Centritto, F. Cellular and molecular determinants of all- trans retinoic acid sensitivity in breast cancer: Luminal phenotype and RAR α expression / F. Centritto, G. Paroni, M. Bolis [et al.] // *EMBO Molecular Medicine*. – 2015. – Vol.7. – №7. – P.950-972.
37. Chen, A.C. Homozygous deletion of the CRABPI gene in AB1 embryonic stem cells results in increased CRABPII gene expression and decreased intracellular retinoic acid concentration / A.C. Chen, K. Yu, M.A. Lane, L.J. Gudas // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2003. – Vol.411. – №2. – P.159-173.
38. Chen, G.Q. Pharmacokinetics and efficacy of low-dose all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia / G.Q. Chen, Z.X. Shen, F. Wu, J.Y. Han, J.M. Miao, H.J. Zhong, X.S. Li, J.Q. Zhao, J. Zhu, Z.W. Fang, S.J. Chen, Z. Chen, Z.Y. Wang // *Leukemia*. – 1996. – Vol.10. – №5. – P.825-828.
39. Chen, L.I. Downstream codons in the retinoic acid receptor β -2 and β -4 mRNAs initiate translation of a protein isoform that disrupts retinoid-activated transcription / L.I. Chen, K.M. Sommer, K. Swisshelml // *Journal of Biological Chemistry*. – 2002. – Vol.277. – №38. – P.35411-35421.
40. Chen, Q. Downregulation of CRABP2 Inhibit the Tumorigenesis of Hepatocellular Carcinoma in Vivo and in Vitro / Q. Chen, L. Tan, Z. Jin, Y. Liu, Z. Zhang // *BioMed Research International*. – 2020. – Vol.2020. – P.3098327.
41. Chim, C.S. All-trans retinoic acid (ATRA) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL) / C.S. Chim, Y.L. Kwong, R. Liang, Y.C. Chu, C.H. Chan, L.C. Chan, K.F. Wong, T.K. Chan // *Hematological Oncology*. – 1996. – Vol.14. – №3. – P.147-154.
42. Chlapek, P. Why differentiation therapy sometimes fails: Molecular mechanisms of resistance to retinoids / P. Chlapek, V. Slavikova, P. Mazanek, J. Sterba, R. Veselska // *International*

Journal of Molecular Sciences. – 2018. – Vol.19. – №1. – P.132.

43. Choi, W.-S. Abstract 1401: MYC mediates retinoic acid resistance by suppressing cellular retinoic acid-binding protein (CRABP2) transcription in HER2-enriched breast cancers / W.-S. Choi, R.-Z. Liu, R. Godbout // *Cancer Research*. – 2021. – Vol.81. – №13_Supplement. – P.1401-1401.

44. Christov, K. The Novel RAR β Isoform (β 5) is a Potential Target of Retinoids in Breast Cancer / K. Christov // *Current Cancer Drug Targets*. – 2009. – Vol.9. – №2. – P.142-147.

45. Clagett-Dame, M. The role of vitamin A in mammalian reproduction and embryonic development / M. Clagett-Dame, H.F. DeLuca // *Annual Review of Nutrition*. – 2002. – Vol.22. – P.347-381.

46. Clarke, S.D. Cellular lipid binding proteins: expression, function, and nutritional regulation 1 / S.D. Clarke, M.K. Armstrong // *The FASEB Journal*. – 1989. – Vol.3. – №13. – P.2480-2487.

47. Coccaro, N. RARA and RARG gene downregulation associated with EZH2 mutation in acute promyelocytic-like morphology leukemia / N. Coccaro, A. Zagaria, P. Orsini, L. Anelli, G. Tota, P. Casieri, L. Impera, A. Minervini, C.F. Minervini, C. Cumbo, E. Parciante, A. Mestice, M. Delia, C. Brunetti, G. Specchia, F. Albano // *Human Pathology*. – 2018. – Vol.80. – P.82-86.

48. Collins, S.J. The role of retinoids and retinoic acid receptors in normal hematopoiesis / S.J. Collins // *Leukemia*. – 2002. – Vol.16. – №10. – P.1896-1905.

49. Connolly, R.M. Molecular pathways: Current role and future directions of the retinoic acid pathway in cancer prevention and treatment / R.M. Connolly, N.K. Nguyen, S. Sukumar // *Clinical Cancer Research*. – 2013. – Vol.19. – №7. – P.1651-1959.

50. Conrad, E.A. Differential Effects of Retinoic Acid and 7,8-Benzoflavone on the Induction of Mouse Skin Tumors by the Complete Carcinogenesis Process and by the Initiation-Promotion Regimen / E.A. Conrad, R.K. Boutwell // *Cancer Research*. – 1982. – Vol.42. – №9. – P.3519-3525.

51. Corral, R.D. Del. Opposing FGF and retinoid pathways control ventral neural pattern, neuronal differentiation, and segmentation during body axis extension / R.D. Del Corral, I. Olivera-Martinez, A. Goriely, E. Gale, M. Maden, K. Storey // *Neuron*. – 2003. – Vol.40. – №1. – P.65-79.

52. Coyle, K.M. Dna methylation predicts the response of triple-negative breast cancers to all-trans retinoic acid / K.M. Coyle, C.A. Dean, M.L. Thomas, D. Vidovic, C.A. Giacomantonio, L. Helyer, P. Marcato // *Cancers*. – 2018. – Vol.10. – №11. – P.397.

53. Cunningham, T.J. Mechanisms of retinoic acid signalling and its roles in organ and limb development / T.J. Cunningham, G. Duyster // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2015. – Vol.16. – №2. – P.110-123.

54. Danos, P. Promoter hypermethylation of RARB and GSTP1 genes in plasma cell-free DNA as breast cancer biomarkers in Peruvian women / P. Danos, S. Giannoni-Luza, A.G. Murillo Carrasco, O. Acosta, M.L. Guevara-Fujita, J.M. Cotrina Concha, H. Guerra Miller, J. Pinto Oblitas, A.

Aguilar Cartagena, J. Araujo Soria, R. Fujita, J.L. Buleje Sono // *Molecular Genetics and Genomic Medicine*. – 2023. – P.e2260.

55. David, M. Adverse Effects of Retinoids / M. David, E. Hodak, N.J. Lowe // *Medical Toxicology and Adverse Drug Experience*. – 1988. – Vol.3. – №4. – P.273-288.

56. Delva, L. Resistance to all-Trans retinoic acid (ATRA) therapy in relapsing acute promyelocytic leukemia: Study of in vitro ATRA sensitivity and cellular retinoic acid binding protein levels in leukemic cells / L. Delva, M. Cornic, N. Balitrand, F. Guidez, J.M. Miclea, A. Delmer, F. Teillet, P. Fenaux, S. Castaigne, L. Degos, C. Chomienne // *Blood*. – 1993. – Vol.82. – №7. – P.2175-2181.

57. Demary, K. Redox control of retinoic acid receptor activity: A novel mechanism for retinoic acid resistance in melanoma cells / K. Demary, L. Wong, J.S. Liou, D. V. Faller, R.A. Spanjaard // *Endocrinology*. – 2001. – Vol.142. – №6. – P.2600-2605.

58. Dersch, H. Induction of normal cardiovascular development in the vitamin A-deprived quail embryo by natural retinoids / H. Dersch, M.H. Zile // *Developmental Biology*. – 1993. – Vol.160. – №2. – P.424-433.

59. Diaz, P. Development and Characterization of Novel and Selective Inhibitors of Cytochrome P450 CYP26A1, the Human Liver Retinoic Acid Hydroxylase / P. Diaz, W. Huang, C.M. Keyari, B. Buttrick, L. Price, N. Guilloteau, S. Tripathy, V.G. Sperandio, F.R. Fronczek, F. Astruc-Diaz, N. Isoherranen // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2016. – Vol.59. – №6. – P.2579-2595.

60. Dickman, E.D. Temporally-regulated retinoic acid depletion produces specific neural crest, ocular and nervous system defects / E.D. Dickman, C. Thaller, S.M. Smith // *Development*. – 1997. – Vol.124. – №16. – P.3111-3121.

61. Donato, L.J. Suppression of mammary carcinoma growth by retinoic acid: Proapoptotic genes are targets for retinoic acid receptor and cellular retinoic acid-binding protein II signaling / L.J. Donato, N. Noy // *Cancer Research*. – 2005. – Vol.65. – №18. – P.8193-8199.

62. Donato, L.J. Suppression of mammary carcinoma cell growth by retinoic acid: The cell cycle control gene Btg2 is a direct target for retinoic acid receptor signaling / L.J. Donato, J.H. Suh, N. Noy // *Cancer Research*. – 2007. – Vol.67. – №2. – P.609-615.

63. Dong, D. Distinct roles for cellular retinoic acid-binding proteins I and II in regulating signaling by retinoic acid / D. Dong, S.E. Ruuska, D.J. Levinthal, N. Noy // *Journal of Biological Chemistry*. – 1999. – Vol.274. – №34. – P.23695-23698.

64. Dou, M. Clinical Significance of Retinoic Acid Receptor Beta Promoter Methylation in Prostate Cancer: A Meta-Analysis / M. Dou, X. Zhou, Z. Fan, X. Ding, L. Li, S. Wang, W. Xue, H. Wang, Z. Suo, X. Deng // *Cellular Physiology and Biochemistry*. – 2018. – Vol.45. – №6. – P.2497-2505.

65. Edward, M. Different susceptibilities of melanoma cells to retinoic acid-induced changes in melanotic expression / M. Edward, J.A. Gold, R.M. MacKie // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1988. – Vol.155. – №2. – P.773-778.
66. Eichele, G. Retinoic acid induces a pattern of digits in anterior half wing buds that lack the zone of polarizing activity / G. Eichele // *Development*. – 1989. – Vol.107. – №4. – P.863-867.
67. Eichele, G. Retinoids and vertebrate limb pattern formation / G. Eichele // *Trends in Genetics*. – 1989. – Vol.5. – №C. – P.246-251.
68. 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. Tchevkina // *Biochemistry (Moscow)*. – 2023. – Vol.88. – №12. – P.2107-2124.
69. Enikeev, A.D. Non-Canonical Activity of Retinoic Acid As a Possible Mechanism of Retinoid Resistance in Cancer Therapy / A.D. Enikeev, A. V. Komelkov, M.E. Akselrod, E.M. Tchevkina // *Rossijskij Bioterapevticeskij Zurnal*. – 2019. – Vol.18. – №4. – P.43-50.
70. 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. Tchevkina // *Biochemistry (Moscow)*. – 2021. – Vol.86. – №2. – P.217-229.
71. Enikeev, A.D. Resistance of breast cancer cells to all-trans retinoic acid is associated with a decrease in the basal level of nuclear receptor RAR α expression and induction of cytochrome CYP26A1 and CYP26B1 expression / A.D. Enikeev, A. V. Komelkov, N. V. Elkina, M.E. Akselrod, S.A. Kuzmichev, E.M. Tchevkina // *Uspehi Molekularnoj Onkologii*. – 2022. – Vol.9. – №2. – P.66-78.
72. Erkelens, M.N. Retinoic Acid and Immune Homeostasis: A Balancing Act / M.N. Erkelens, R.E. Mebius // *Trends in Immunology*. – 2017. – Vol.38. – №3. – P.168-180.
73. Favorskaya, I. Expression and clinical significance of CRABP1 and CRABP2 in non-small cell lung cancer / I. Favorskaya, Y. Kainov, G. Chemeris, A. Komelkov, I. Zborovskaya, E. Tchevkina // *Tumor Biology*. – 2014. – Vol.35. – №10. – P.10295-10300.
74. Feng, X. CRABP2 regulates invasion and metastasis of breast cancer through hippo pathway dependent on ER status / X. Feng, M. Zhang, B. Wang, C. Zhou, Y. Mu, J. Li, X. Liu, Y. Wang, Z. Song, P. Liu // *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. – 2019. – Vol.38. – №1.
75. Ferlay, J. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. / J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D.M. Parkin, D. Forman, F. Bray // *International journal of cancer*. – 2015. – Vol.136. – №5. – P.E359-86.
76. Ferrolino, M.C. Delicate balance between functionally required flexibility and aggregation

risk in a β -rich protein / M.C. Ferrolino, A. Zhuravleva, I.L. Budyak, B. Krishnan, L.M. Gierasch // *Biochemistry*. – 2013. – Vol.52. – №49. – P.8843-8854.

77. Fiorella, P.D. Expression of cellular retinoic acid binding protein (CRABP) in *Escherichia coli*. Characterization and evidence that holo-CRABP is a substrate in retinoic acid metabolism / P.D. Fiorella, J.L. Napoli // *Journal of Biological Chemistry*. – 1991. – Vol.266. – №25. – P.16572-16579.

78. Freemantle, S.J. Retinoids in cancer therapy and chemoprevention: Promise meets resistance / S.J. Freemantle, M.J. Spinella, E. Dmitrovsky // *Oncogene*. – 2003. – Vol.22. – №47 REV. ISS. 6. – P.7305-7315.

79. Frick, M. Coassembly of Flotillins Induces Formation of Membrane Microdomains, Membrane Curvature, and Vesicle Budding / M. Frick, N.A. Bright, K. Riento, A. Bray, C. Merrified, B.J. Nichols // *Current Biology*. – 2007. – Vol.17. – №13. – P.1151-1156.

80. Garattini, E. Retinoids and breast cancer: From basic studies to the clinic and back again / E. Garattini, M. Bolis, S.K. Garattini, M. Fratelli, F. Centritto, G. Paroni, M. Gianni', A. Zanetti, A. Pagani, J.N. Fisher, A. Zambelli, M. Terao // *Cancer Treatment Reviews*. – 2014. – Vol.40. – №6. – P.739-749.

81. Garattini, E. Retinoids as Differentiating Agents in Oncology: A Network of Interactions with Intracellular Pathways as the Basis for Rational Therapeutic Combinations / E. Garattini, M. Gianni, M. Terao // *Current Pharmaceutical Design*. – 2007. – Vol.13. – №13. – P.1375-1400.

82. García-Regalado, A. Activation of Akt pathway by transcription-independent mechanisms of retinoic acid promotes survival and invasion in lung cancer cells / A. García-Regalado, M. Vargas, A. García-Carrancá, E. Aréchaga-Ocampo, C.H. González-De la Rosa // *Molecular Cancer*. – 2013. – Vol.12. – №1. – P.44.

83. Gaub, M.P. Nuclear detection of cellular retinoic acid binding proteins I and II with new antibodies / M.P. Gaub, Y. Lutz, N.B. Ghyselinck, I. Scheuer, V. Pfister, P. Chambon, C. Rochette-Egly // *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. – 1998. – Vol.46. – №10. – P.1103-1111.

84. Geisen, C. High-level expression of the retinoic acid receptor β gene in normal cells of the uterine cervix is regulated by the retinoic acid receptor α and is abnormally down-regulated in cervical carcinoma cells / C. Geisen, C. Denk, B. Gremm, C. Baust, A. Karger, W. Bollag, E. Schwarz // *Cancer Research*. – 1997. – Vol.57. – №8. – P.1460-1467.

85. Geoffroy, M.C. Classic and variants APLs, as viewed from a therapy response / M.C. Geoffroy, H. de Thé // *Cancers*. – 2020. – Vol.12. – №4.

86. Germain, P. International union of pharmacology. LX. Retinoic acid receptors / P. Germain, P. Chambon, G. Eichele, R.M. Evans, M.A. Lazar, M. Leid, A.R. De Lera, R. Lotan, D.J. Mangelsdorf, H. Gronemeyer // *Pharmacological Reviews*. – 2006. – Vol.58. – №4. – P.712-725.

87. Ghyselinck, N.B. Role of the retinoic acid receptor beta (RAR β) during mouse

development / N.B. Ghyselinck, V. Dupé, A. Dierich, N. Messaddeq, J.M. Garnier, C. Rochette-Egly, P. Chambon, M. Mark // *International Journal of Developmental Biology*. – 1997. – Vol.41. – №3. – P.425-447.

88. Gianni, M. P38MAPK-dependent phosphorylation and degradation of SRC-3/AIB1 and RAR α -mediated transcription / M. Gianni, E. Parrella, I. Raska, E. Gaillard, E.A. Nigro, C. Gaudon, E. Garattini, C. Rochette-Egly // *EMBO Journal*. – 2006. – Vol.25. – №4. – P.739-751.

89. Gladwin, M.T. Retinoic acid reduces p11 protein levels in bronchial epithelial cells by a posttranslational mechanism / M.T. Gladwin, X.L. Yao, M. Cowan, X.L. Huang, R. Schneider, L.R. Grant, C. Logun, J.H. Shelhamer // *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. – 2000. – Vol.279. – №6 23-6. – P.L1103-9.

90. Gronemeyer, H. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily / H. Gronemeyer, J.Å. Gustafsson, V. Laudet // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2004. – Vol.3. – №11. – P.950-964.

91. Gupta, A. Cellular retinoic acid-binding protein II is a direct transcriptional target of MycN in neuroblastoma / A. Gupta, B.R.G. Williams, S.M. Hanash, J. Rawwas // *Cancer Research*. – 2006. – Vol.66. – №16. – P.8100-8108.

92. Gutiérrez-González, L.H. Solution structure and backbone dynamics of human epidermal-type fatty acid-binding protein (E-FABP) / L.H. Gutiérrez-González, C. Ludwig, C. Hohoff, M. Rademacher, T. Hanhoff, H. Rüterjans, F. Spener, C. Lücke // *Biochemical Journal*. – 2002. – Vol.364. – №3. – P.725-737.

93. Hawthorn, L. TIMP1 and SERPIN-A overexpression and TFF3 and CRABP1 underexpression as biomarkers for papillary thyroid carcinoma / L. Hawthorn, L. Stein, R. Varma, S. Wiseman, T. Loree, D.F. Tan // *Head and Neck*. – 2004. – Vol.26. – №12. – P.1069-1083.

94. Hayashi, K. Differential effects of retinoic acid on the growth of isogenic metastatic and non-metastatic breast cancer cell lines and their association with distinct expression of retinoic acid receptor beta isoforms 2 and 4. / K. Hayashi, S. Goodison, V. Urquidi, D. Tarin, R. Lotan, E. Tahara // *International journal of oncology*. – 2003. – Vol.22. – №3. – P.623-629.

95. Helms, J.A. Retinoic acid signaling is required during early chick limb development / J.A. Helms, C.H. Kim, G. Eichele, C. Thaller // *Development*. – 1996. – Vol.122. – №5. – P.1385-1394.

96. Heninger, E. Live cell molecular analysis of primary prostate cancer organoids identifies persistent androgen receptor signaling / E. Heninger, D. Kosoff, T.S. Rodems, N. Sethakorn, A. Singh, H. Gungurthi, K.N. Carlson, B. Yang, C. Gilsdorf, C.A. Pasch, D.A. Deming, L. Ellis, D.J. Beebe, D.F. Jarrard, J.M. Lang // *Medical Oncology*. – 2021. – Vol.38. – №11. – P.135.

97. Henion, P.D. Retinoic acid selectively promotes the survival and proliferation of neurogenic precursors in cultured neural crest cell populations / P.D. Henion, J.A. Weston //

Developmental Biology. – 1994. – Vol.161. – №1. – P.243-250.

98. Heyman, R.A. 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor / R.A. Heyman, D.J. Mangelsdorf, J.A. Dyck, R.B. Stein, G. Eichele, R.M. Evans, C. Thaller // Cell. – 1992. – Vol.68. – №2. – P.397-406.

99. Hind, M. Retinoic acid induces alveolar regeneration in the adult mouse lung / M. Hind, M. Maden // European Respiratory Journal. – 2004. – Vol.23. – №1. – P.20-27.

100. Hong, W.K. 13- cis -Retinoic Acid in the Treatment of Oral Leukoplakia / W.K. Hong, J. Endicott, L.M. Itri, W. Doos, J.G. Batsakis, R. Bell, S. Fofonoff, R. Byers, E.N. Atkinson, C. Vaughan, B.B. Toth, A. Kramer, I.W. Dimery, P. Skipper, S. Strong // New England Journal of Medicine. – 1986. – Vol.315. – №24. – P.1501-1505.

101. Hong, W.K. Prevention of Second Primary Tumors with Isotretinoin in Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck / W.K. Hong, S.M. Lippman, L.M. Itri, D.D. Karp, J.S. Lee, R.M. Byers, S.P. Schantz, A.M. Kramer, R. Lotan, L.J. Peters, I.W. Dimery, B.W. Brown, H. Goepfert // New England Journal of Medicine. – 1990. – Vol.323. – №12. – P.795-801.

102. Huang, T. Meta-analyses of gene methylation and smoking behavior in non-small cell lung cancer patients / T. Huang, X. Chen, Q. Hong, Z. Deng, H. Ma, Y. Xin, Y. Fang, H. Ye, R. Wang, C. Zhang, M. Ye, S. Duan // Scientific Reports. – 2015. – Vol.5. – P.8897.

103. Huang, Y. Hypermethylation, but not LOH, is associated with the low expression of MT1G and CRABP1 in papillary thyroid carcinoma / Y. Huang, A. De la Chapelle, N.S. Pellegata // International Journal of Cancer. – 2003. – Vol.104. – №6. – P.735-744.

104. Ignatova, Z. Monitoring protein stability and aggregation in vivo by real-time fluorescent labeling / Z. Ignatova, L.M. Gierasch // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2004. – Vol.101. – №2. – P.523-528.

105. Ishibe, T. Neuronal differentiation of synovial sarcoma and its therapeutic application / T. Ishibe, T. Nakayama, T. Aoyama, T. Nakamura, J. Toguchida // Clinical Orthopaedics and Related Research. – 2008. – Vol.466. – №9. – P.2147-2155.

106. Ishikawa, J. 13-Cis-Retinoic Acid Alters the Cellular Morphology of Slice-Cultured Serotonergic Neurons in the Rat / J. Ishikawa, C. Sutoh, A. Ishikawa, H. Kagechika, H. Hirano, S. Nakamura // European Journal of Neuroscience. – 2008. – Vol.27. – №9. – P.2363-2372.

107. Iwata, M. Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells / M. Iwata, A. Hirakiyama, Y. Eshima, H. Kagechika, C. Kato, S.Y. Song // Immunity. – 2004. – Vol.21. – №4. – P.527-538.

108. Jacobs, S. Retinoic acid is required early during adult neurogenesis in the dentate gyrus / S. Jacobs, D.C. Lie, K.L. DeCicco, Y. Shi, L.M. DeLuca, F.H. Gage, R.M. Evans // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2006. – Vol.103. – №10. – P.3902-

3907.

109. Jin, B.Y. CRABP2 and FABP5 identified by 2D DIGE profiling are upregulated in human bladder cancer / B.Y. Jin, G.H. Fu, X. Jiang, H. Pan, D.K. Zhou, X.Y. Wei, L. Zhou, L. Chung, S. Sen Zheng // Chinese Medical Journal. – 2013. – Vol.126. – №19. – P.3787-3789.

110. Jing, Y. The cellular retinoic acid binding protein II is a positive regulator of retinoic acid signaling in breast cancer cells / Y. Jing, S. Waxman, R. Mira-y-Lopez // Cancer Research. – 1997. – Vol.57. – №9. – P.1668-1672.

111. Kainov, Y. CRABP1 provides high malignancy of transformed mesenchymal cells and contributes to the pathogenesis of mesenchymal and neuroendocrine tumors / Y. Kainov, I. Favorskaya, V. Delektorskaya, G. Chemeris, A. Komelkov, A. Zhuravskaya, L. Trukhanova, E. Zueva, B. Tavitian, N. Dyakova, I. Zborovskaya, E. Tchevkina // Cell Cycle. – 2014. – Vol.13. – №10. – P.1530-1539.

112. Kang, S. Application of retinol to human skin in vivo induces epidermal hyperplasia and cellular retinoid binding proteins characteristic of retinoic acid but without measurable retinoic acid levels or irritation / S. Kang, E.A. Duell, G.J. Fisher, S.C. Datta, Z.Q. Wang, A.P. Reddy, A. Tavakkol, J.Y. Yi, C.E.M. Griffiths, J.T. Elder, J.J. Voorhees // Journal of Investigative Dermatology. – 1995. – Vol.105. – №4. – P.549-556.

113. Khuri, F.R. Molecular epidemiology and retinoid chemoprevention of head and neck cancer / F.R. Khuri, S.M. Lippman, M.R. Spitz, R. Lotan, W.K. Hong // Journal of the National Cancer Institute. – 1997. – Vol.89. – №3. – P.199-211.

114. Kim, H. The retinoic acid synthesis gene ALDH1a2 is a candidate tumor suppressor in prostate cancer / H. Kim, J. Lapointe, G. Kaygusuz, D.E. Ong, C. Li, M. Van De Rijn, J.D. Brooks, J.R. Pollack // Cancer Research. – 2005. – Vol.65. – №18. – P.8118-8124.

115. Kini, A.R. Angiogenesis in acute promyelocytic leukemia: Induction by vascular endothelial growth factor and inhibition by all-trans retinoic acid / A.R. Kini, L.A.C. Peterson, M.S. Tallman, M.W. Lingen // Blood. – 2001. – Vol.97. – №12. – P.3919-3924.

116. Kitareewan, S. UBE1L is a retinoid target that triggers PML/RAR α degradation and apoptosis in acute promyelocytic leukemia / S. Kitareewan, I. Pitha-Rowe, D. Sekula, C.H. Lowrey, M.J. Nemeth, T.R. Golub, S.J. Freemantle, E. Dmitrovsky // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2002. – Vol.99. – №6. – P.3806-3811.

117. Kleywegt, G.J. Crystal structures of cellular retinoic acid binding proteins I and II in complex with all-trans-retinoic acid and a synthetic retinoid / G.J. Kleywegt, T. Bergfors, H. Senn, P. Le Motte, B. Gsell, K. Shud, T.A. Jones // Structure. – 1994. – Vol.2. – №12. – P.1241-1258.

118. Langenfeld, J. Posttranslational regulation of cyclin D1 by retinoic acid: A chemoprevention mechanism / J. Langenfeld, H. Kiyokawa, D. Sekula, J. Boyle, E. Dmitrovsky // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1997. – Vol.94. –

№22. – P.12070-12074.

119. Lee, H.S. Prognostic implications of and relationship between CpG island hypermethylation and repetitive DNA hypomethylation in hepatocellular carcinoma / H.S. Lee, B.H. Kim, N.Y. Cho, E.J. Yoo, M. Choi, S.H. Shin, J.J. Jang, K.S. Suh, Y.S. Kim, G.H. Kang // *Clinical Cancer Research*. – 2009. – Vol.15. – №3. – P.812-820.

120. Lee, J.H. Retinoic acid and its binding protein modulate apoptotic signals in hypoxic hepatocellular carcinoma cells / J.H. Lee, J.H. Yoon, S.J. Yu, G.E. Chung, E.U. Jung, H.Y. Kim, B.H. Kim, D.H. Choi, S.J. Myung, Y.J. Kim, C.Y. Kim, H.S. Lee // *Cancer Letters*. – 2010. – Vol.295. – №2. – P.229-235.

121. Leede, B.J.M. Van Der. Autoinduction of retinoic acid metabolism to polar derivatives with decreased biological activity in retinoic acid-sensitive, but not in retinoic acid-resistant human breast cancer cells / B.J.M. Van Der Leede, C.E. Van Den Brink, W.W.M. Pijnappel, E. Sonneveld, P.T. Van Der Saag, B. Van Der Burg // *Journal of Biological Chemistry*. – 1997. – Vol.272. – №29. – P.17921-17928.

122. Levi, L. Genetic ablation of the fatty acid-binding protein FABP5 suppresses HER2-induced mammary tumorigenesis / L. Levi, G. Lobo, M.K. Doud, J. Von Lintig, D. Seachrist, G.P. Tochtrop, N. Noy // *Cancer Research*. – 2013. – Vol.73. – №15. – P.4770-4780.

123. Lin, Y.W. Regulation of exosome secretion by cellular retinoic acid binding protein 1 contributes to systemic anti-inflammation / Y.W. Lin, J. Nhieu, C.W. Wei, Y.L. Lin, H. Kagechika, L.N. Wei // *Cell Communication and Signaling*. – 2021. – Vol.19. – №1. – P.69.

124. Lind, G.E. ADAMTS1, CRABP1, and NR3C1 identified as epigenetically deregulated genes in colorectal tumorigenesis / G.E. Lind, K. Kleivi, G.I. Meling, M.R. Teixeira, E. Thiis-Evensen, T.O. Rognum, R.A. Lothe // *Cellular Oncology*. – 2006. – Vol.28. – №5-6. – P.259-272.

125. Liu, R.Z. CRABP1 is associated with a poor prognosis in breast cancer: Adding to the complexity of breast cancer cell response to retinoic acid / R.Z. Liu, E. Garcia, D.D. Glubrecht, H.Y. Poon, J.R. Mackey, R. Godbout // *Molecular Cancer*. – 2015. – Vol.14. – №1. – P.129.

126. Liu, R.Z. Association between cytoplasmic CRABP2, altered retinoic acid signaling, and poor prognosis in glioblastoma / R.Z. Liu, S. Li, E. Garcia, D.D. Glubrecht, H. Yin Poon, J.C. Easaw, R. Godbout // *Glia*. – 2016. – Vol.64. – №6. – P.963-976.

127. Liu, Y. Retinoic Acid Receptor β Mediates the Growth-Inhibitory Effect of Retinoic Acid by Promoting Apoptosis in Human Breast Cancer Cells / Y. Liu, M.-O. Lee, H.-G. Wang, Y. Li, Y. Hashimoto, M. Klaus, J.C. Reed, X.-K. Zhang // *Molecular and Cellular Biology*. – 1996. – Vol.16. – №3. – P.1138-1149.

128. Lohnes, D. Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development. (I) Craniofacial and skeletal abnormalities in RAR double mutants / D. Lohnes, M. Mark, C. Mendelsohn,

P. Dolle, A. Dierich, P. Gorry, A. Gansmuller, P. Chambon // *Development*. – 1994. – Vol.120. – №10. – P.2723-2748.

129. Lokshin, A. Early effects of retinoic acid on proliferation, differentiation and apoptosis in non-small cell lung cancer cell lines / A. Lokshin, H. Zhang, J. Mayotte, M. Lokshin, M.L. Levitt // *Anticancer Research*. – 1999. – Vol.19. – №6 B. – P.5251-5254.

130. López-Carballo, G. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway by retinoic acid is required for neural differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells / G. López-Carballo, L. Moreno, S. Masiá, P. Pérez, D. Baretino // *Journal of Biological Chemistry*. – 2002. – Vol.277. – №28. – P.25297-25304.

131. Lu, Y. A gene expression signature predicts survival of patients with stage I non-small cell lung cancer / Y. Lu, W. Lemon, P.Y. Liu, Y. Yi, C. Morrison, P. Yang, Z. Sun, J. Szoke, W.L. Gerald, M. Watson, R. Govindan, M. You // *PLoS Medicine*. – 2006. – Vol.3. – №12. – P.2229-2243.

132. Lüscher, B. Regulation of transcription factor AP-2 by the morphogen retinoic acid and by second messengers. / B. Lüscher, P.J. Mitchell, T. Williams, R. Tjian // *Genes & development*. – 1989. – Vol.3. – №10. – P.1507-1517.

133. Maden, M. Retinoid signalling in the development of the central nervous system / M. Maden // *Nature Reviews Neuroscience*. – 2002. – Vol.3. – №11. – P.843-853.

134. Maire, A. Le. A unique secondary-structure switch controls constitutive gene repression by retinoic acid receptor / A. Le Maire, C. Teyssier, C. Erb, M. Grimaldi, S. Alvarez, A.R. De Lera, P. Balaguer, H. Gronemeyer, C.A. Royer, P. Germain, W. Bourguet // *Nature Structural and Molecular Biology*. – 2010. – Vol.17. – №7. – P.801-807.

135. Maiti, T.K. Binding of all-trans retinoic acid to human serum albumin: Fluorescence, FT-IR and circular dichroism studies / T.K. Maiti, K.S. Ghosh, J. Debnath, S. Dasgupta // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2006. – Vol.38. – №3-5. – P.197-202.

136. Mallikarjuna, K. Comparative proteomic analysis of differentially expressed proteins in primary retinoblastoma tumors / K. Mallikarjuna, C.S. Sundaram, Y. Sharma, P.R. Deepa, V. Khetan, L. Gopal, J. Biswas, T. Sharma, S. Krishnakumar // *Proteomics - Clinical Applications*. – 2010. – Vol.4. – №4. – P.449-463.

137. Markham, N.O. Linking ALDH1 and retinoic acid signaling / N.O. Markham, W.J. Huh, R.J. Coffey // *Oncotarget*. – 2019. – Vol.10. – №12. – P.1226-1227.

138. Masiá, S. Rapid, nongenomic actions of retinoic acid on phosphatidylinositol-3-kinase signaling pathway mediated by the retinoic acid receptor / S. Masiá, S. Alvarez, A.R. De Lera, D. Baretino // *Molecular Endocrinology*. – 2007. – Vol.21. – №10. – P.2391-2402.

139. Mendelsohn, C. Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development. (II) Multiple abnormalities at various stages of organogenesis in RAR double mutants / C. Mendelsohn, D.

Lohnes, D. Decimo, T. Lufkin, M. LeMeur, P. Chambon, M. Mark // *Development*. – 1994. – Vol.120. – №10. – P.2749-2771.

140. Meyskens, F.L. A phase I trial of β -all-trans-retinoic acid delivered via a collagen sponge and a cervical cap for mild or moderate intraepithelial cervical neoplasia / F.L. Meyskens, V. Graham, M. Chvapil, R.T. Dorr, D.S. Alberts, E.A. Surwit // *Journal of the National Cancer Institute*. – 1983. – Vol.71. – №5. – P.921-925.

141. Miyake, T. CRABP1-reduced expression is associated with poorer prognosis in serous and clear cell ovarian adenocarcinoma / T. Miyake, Y. Ueda, S. Matsuzaki, T. Miyatake, K. Yoshino, M. Fujita, T. Nomura, T. Enomoto, T. Kimura // *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. – 2011. – Vol.137. – №4. – P.715-722.

142. Mohammad Sultan, K.M.C. Retinoid Signaling in Cancer and Its Promise for Therapy / K.M.C. Mohammad Sultan // *Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis*. – 2013. – Vol.S7. – P.6.

143. Mora, J.R. Generation of gut-homing IgA-secreting B cells by intestinal dendritic cells / J.R. Mora, M. Iwata, B. Eksteen, S.Y. Song, T. Junt, B. Senman, K.L. Otipoby, A. Yokota, H. Takeuchi, P. Ricciardi-Castagnoli, K. Rajewsky, D.H. Adams, U.H. Von Andrian // *Science*. – 2006. – Vol.314. – №5802. – P.1157-1160.

144. Moreb, J.S. Use of retinoic acid/aldehyde dehydrogenase pathway as potential targeted therapy against cancer stem cells / J.S. Moreb, D.A. Ucar-Bilyeu, A. Khan // *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. – 2017. – Vol.79. – №2. – P.295-301.

145. Morikawa, K. All-trans-retinoic acid accelerates the differentiation of human B lymphocytes maturing into plasma cells / K. Morikawa, M. Nonaka // *International Immunopharmacology*. – 2005. – Vol.5. – №13-14. – P.1830-1838.

146. Mrass, P. Retinoic acid increases the expression of p53 and proapoptotic caspases and sensitizes keratinocytes to apoptosis: A possible explanation for tumor preventive action of retinoids / P. Mrass, M. Rendl, M. Mildner, F. Gruber, B. Lengauer, C. Ballaun, L. Eckhart, E. Tschachler // *Cancer Research*. – 2004. – Vol.64. – №18. – P.6542-6548.

147. Nagai, J.I. Retinoic acid induces neuroblastoma cell death by inhibiting proteasomal degradation of retinoic acid receptor α / J.I. Nagai, T. Yazawa, K. Okudela, H. Kigasawa, H. Kitamura, H. Osaka // *Cancer Research*. – 2004. – Vol.64. – №21. – P.7910-7917.

148. Nagpal, I. All-trans retinoic acid as a versatile cytosolic signal modulator mediated by CRABP1 / I. Nagpal, L.N. Wei // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol.20. – №15.

149. Nagpal, S. RAR- β 4, a retinoic acid receptor isoform is generated from RAR- β 2 by alternative splicing and usage of a CUG initiator codon / S. Nagpal, A. Zelent, P. Chambon // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1992. – Vol.89. –

№7. – P.2718-2722.

150. Napoli, J. Physiological occurrence, biosynthesis and metabolism of retinoic acid: evidence for roles of Cellular Retinol-Binding Protein (CRBP) and Cellular Retinoic Acid-Binding Protein (CRABP) in the pathway of retinoic acid homeostasis / J. Napoli, K. Posch, P. Fiorella, M. Boerman // *Biomedicine and Pharmacotherapy*. – 1991. – Vol.45. – №4-5. – P.131-143.

151. Napoli, J.L. Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism / J.L. Napoli // *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. – 1999. – Vol.1440. – №2-3. – P.139-162.

152. Nelson, C. Therapeutic Potential of the Inhibition of the Retinoic Acid Hydroxylases CYP26A1 and CYP26B1 by Xenobiotics / C. Nelson, B. Buttrick, N. Isoherranen // *Current Topics in Medicinal Chemistry*. – 2013. – Vol.13. – №12. – P.1402-1428.

153. Nguyen, P.H. All-trans retinoic acid targets gastric cancer stem cells and inhibits patient-derived gastric carcinoma tumor growth / P.H. Nguyen, J. Giraud, C. Staedel, L. Chambonnier, P. Dubus, E. Chevret, H. Bœuf, X. Gauthereau, B. Rousseau, M. Fevre, I. Soubeyran, G. Belleannée, S. Evrard, D. Collet, F. Mégraud, C. Varon // *Oncogene*. – 2016. – Vol.35. – №43. – P.5619-5628.

154. Noy, N. Involvement of fatty acid binding protein 5 and PPAR β/δ in prostate cancer cell growth / N. Noy, E. Morgan, P. Kannan-Thulasiraman // *PPAR Research*. – 2010. – Vol.2010. – P.1-9.

155. O.B. Facey, C. Retinoids in Treatment of Colorectal Cancer / C. O.B. Facey, B. M. Boman // *Colorectal Cancer*. – 2021.

156. O'Malley, B.W. Nuclear receptor coregulators in cancer biology / B.W. O'Malley, R. Kumar // *Cancer Research*. – 2009. – Vol.69. – №21. – P.8217-8222.

157. Ochoa, W.F. Retinoic acid binds to the C2-domain of protein kinase C α / W.F. Ochoa, A. Torrecillas, I. Fita, N. Verdaguer, S. Corbalán-García, J.C. Gomez-Fernandez // *Biochemistry*. – 2003. – Vol.42. – №29. – P.8774-8779.

158. Oliveira, L.D.M. Impact of Retinoic Acid on Immune Cells and Inflammatory Diseases / L.D.M. Oliveira, F.M.E. Teixeira, M.N. Sato // *Mediators of Inflammation*. – 2018. – Vol.2018. – P.3067126.

159. Park, D.J. CCAAT/enhancer binding protein ϵ is a potential retinoid target gene in acute promyelocytic leukemia treatment / D.J. Park, A.M. Chumakov, P.T. Vuong, D.Y. Chih, A.F. Gombart, W.H. Miller, H.P. Koeffler // *Journal of Clinical Investigation*. – 1999. – Vol.103. – №10. – P.1399-1408.

160. Paroni, G. Synergistic antitumor activity of lapatinib and retinoids on a novel subtype of breast cancer with coamplification of ERBB2 and RARA / G. Paroni, M. Fratelli, G. Gardini, C. Bassano, M. Flora, A. Zanetti, V. Guarnaccia, P. Ubezio, F. Centritto, M. Terao, E. Garattini // *Oncogene*. – 2012. – Vol.31. – №29. – P.3431-3443.

161. Paroni, G. Retinoic acid sensitivity of triple-negative breast cancer cells characterized by constitutive activation of the notch1 pathway: The role of rar β / G. Paroni, A. Zanetti, M.M. Barzago, M. Kurosaki, L. Guarrera, M. Fratelli, M. Troiani, P. Ubezio, M. Bolis, A. Vallergera, F. Biancardi, M. Terao, E. Garattini // *Cancers*. – 2020. – Vol.12. – №10. – P.1-23.
162. Pavert, S.A. Van De. Maternal retinoids control type 3 innate lymphoid cells and set the offspring immunity / S.A. Van De Pavert, M. Ferreira, R.G. Domingues [et al.] // *Nature*. – 2014. – Vol.508. – №1. – P.123-127.
163. Pavone, M.E. Altered retinoid uptake and action contributes to cell survival in endometriosis / M.E. Pavone, S. Reierstad, H. Sun, M. Milad, S.E. Bulun, Y.H. Cheng // *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. – 2010. – Vol.95. – №11. – P.E300-9.
164. Peng, X. Early in vitro passages of breast cancer cells are differentially susceptible to retinoids and differentially express RAR β isoforms / X. Peng, A. Green, A. Shilkaitis, Y. Zhu, L. Bratescu, K. Christov // *International Journal of Oncology*. – 2011. – Vol.39. – №3. – P.577-583.
165. Peng, X. A novel RAR β isoform directed by a distinct promoter P3 and mediated by retinoic acid in breast cancer cells / X. Peng, T. Maruo, Y. Cao, V. Punj, R. Mehta, T.K. Das Gupta, K. Christov // *Cancer Research*. – 2004. – Vol.64. – №24. – P.8911-8918.
166. Perez-Castro, A. V. Defective lens fiber differentiation and pancreatic tumorigenesis caused by ectopic expression of the cellular retinoic acid-binding protein I / A. V. Perez-Castro, V.T. Tran, M.C. Nguyen-Huu // *Development*. – 1993. – Vol.119. – №2. – P.363-375.
167. Perissi, V. Controlling nuclear receptors: The circular logic of cofactor cycles / V. Perissi, M.G. Rosenfeld // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2005. – Vol.6. – №7. – P.542-554.
168. Persaud, S.D. Cellular retinoic acid binding protein I mediates rapid non-canonical activation of ERK1/2 by all-trans retinoic acid / S.D. Persaud, Y.W. Lin, C.Y. Wu, H. Kagechika, L.N. Wei // *Cellular Signalling*. – 2013. – Vol.25. – №1. – P.19-25.
169. Persaud, S.D. All trans-retinoic acid analogs promote cancer cell apoptosis through non-genomic Crabp1 mediating ERK1/2 phosphorylation / S.D. Persaud, S.W. Park, M. Ishigami-Yuasa, N. Koyano-Nakagawa, H. Kagechika, L.N. Wei // *Scientific Reports*. – 2016. – Vol.6. – P.22396.
170. Petty, W.J. A novel retinoic acid receptor β isoform and retinoid resistance in lung carcinogenesis / W.J. Petty, N. Li, A. Biddle, R. Bounds, C. Nitkin, Y. Ma, K.H. Dragnev, S.J. Freemantle, E. Dmitrovsky // *Journal of the National Cancer Institute*. – 2005. – Vol.97. – №22. – P.1645-1651.
171. Pfoertner, S. Cellular retinoic acid binding protein I: Expression and functional influence in renal cell carcinoma / S. Pfoertner, U. Goelden, W. Hansen, T. Toepfer, R. Geffers, S.N. Ukena, R. Von Knobloch, R. Hofmann, J. Buer, A.J. Schrader // *Tumor Biology*. – 2005. – Vol.26. – №6. – P.313-323.

172. Pirouzpanah, S. Association of folate and other one-carbon related nutrients with hypermethylation status and expression of RARB, BRCA1, and RASSF1A genes in breast cancer patients / S. Pirouzpanah, F.A. Taleban, P. Mehdipour, M. Atri // *Journal of Molecular Medicine*. – 2015. – Vol.93. – №8. – P.917-934.

173. Piskunov, A. A retinoic acid receptor RAR α pool present in membrane lipid rafts forms complexes with G protein α Q to activate p38MAPK / A. Piskunov, C. Rochette-Egly // *Oncogene*. – 2012. – Vol.31. – №28. – P.3333-3345.

174. Plum, L.A. Retinoic acid combined with neurotrophin-3 enhances the survival and neurite outgrowth of embryonic sympathetic neurons / L.A. Plum, L.F. Parada, P. Tsoulfas, M. Clagett-Dame // *Experimental Biology and Medicine*. – 2001. – Vol.226. – №8. – P.766-775.

175. Pourjafar, M. All-trans retinoic acid preconditioning enhances proliferation, angiogenesis and migration of mesenchymal stem cell in vitro and enhances wound repair in vivo / M. Pourjafar, M. Saidijam, K. Mansouri, H. Ghasemibasir, F. Karimi dermani, R. Najafi // *Cell Proliferation*. – 2017. – Vol.50. – №1.

176. Pratt, M.A.C. Differential Regulation of Protein Expression, Growth and Apoptosis by Natural and Synthetic Retinoids / M.A.C. Pratt, M. Niu, D. White // *Journal of Cellular Biochemistry*. – 2003. – Vol.90. – №4. – P.692-708.

177. Privalsky, M.L. Regulation of SMRT and N-CoR corepressor function / M.L. Privalsky // *Current Topics in Microbiology and Immunology*. – 2000. – Vol.254. – P.117-136.

178. Quintero Barceinas, R.S. All-Trans Retinoic Acid Induces Proliferation, Survival, and Migration in A549 Lung Cancer Cells by Activating the ERK Signaling Pathway through a Transcription-Independent Mechanism / R.S. Quintero Barceinas, A. García-Regalado, E. Aréchaga-Ocampo, N. Villegas-Sepúlveda, C.H. González-De La Rosa // *BioMed Research International*. – 2015. – Vol.2015. – P.404368.

179. Radomska-Pandya, A. Direct interaction of all-trans-retinoic acid with protein kinase C (PKC): Implications for PKC signaling and cancer therapy / A. Radomska-Pandya, G. Chen, P.J. Czernik, J.M. Little, V.M. Samokyszyn, C.A. Carter, G. Nowak // *Journal of Biological Chemistry*. – 2000. – Vol.275. – №29. – P.22324-22330.

180. Raelson, J. V. The PML/RAR α oncoprotein is a direct molecular target of retinoic acid in acute promyelocytic leukemia cells / J. V. Raelson, C. Nervi, A. Rosenauer, L. Benedetti, Y. Monczak, M. Pearson, P.G. Pelicci, W.H. Miller // *Blood*. – 1996. – Vol.88. – №8. – P.2826-2832.

181. Raffo, P. Retinoid receptors: Pathways of proliferation inhibition and apoptosis induction in breast cancer cell lines / P. Raffo, L. Emionite, L. Colucci, F. Belmonto, M.G. Moro, W. Bollag, S. Toma // *Anticancer Research*. – 2000. – Vol.20. – №3 A. – P.1535-1543.

182. Ravandi, F. Acute Promyelocytic Leukemia: A Perspective / F. Ravandi, R. Stone //

Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia. – 2017. – Vol.17. – №9. – P.543-544.

183. Ren, M. Impaired Retinoic Acid (RA) Signal Leads to RAR β 2 Epigenetic Silencing and RA Resistance / M. Ren, S. Pozzi, G. Bistulfi, G. Somenzi, S. Rossetti, N. Sacchi // *Molecular and Cellular Biology*. – 2005. – Vol.25. – №23. – P.10591-10603.

184. Reynolds, C.P. Retinoid therapy of high-risk neuroblastoma / C.P. Reynolds, K.K. Matthay, J.G. Villablanca, B.J. Maurer // *Cancer Letters*. – 2003. – Vol.197. – №1-2. – P.185-192.

185. Rhinn, M. Retinoic acid signalling during development / M. Rhinn, P. Dollé // *Development*. – 2012. – Vol.139. – №5. – P.843-858.

186. Rodriguez-Tebar, A. Retinoic acid induces NGF-dependent survival response and high-affinity NGF receptors in immature chick sympathetic neurons / A. Rodriguez-Tebar, H. Rohrer // *Development*. – 1991. – Vol.112. – №3. – P.813-820.

187. Ross, D.T. A comparison of gene expression signatures from breast tumors and breast tissue derived cell lines. / D.T. Ross, C.M. Perou // *Disease markers*. – 2001. – Vol.17. – №2. – P.99-109.

188. Ruff, S.J. Cellular retinoic acid binding protein is associated with mitochondria / S.J. Ruff, D.E. Ong // *FEBS Letters*. – 2000. – Vol.487. – №2. – P.282-286.

189. Sanz, M.A. History of Acute Promyelocytic Leukemia / M.A. Sanz, E. Barragán // *Clinical Hematology International*. – 2021. – Vol.3. – №4. – P.142.

190. Schmoch, T. Combined treatment of atra with epigenetic drugs increases aggressiveness of glioma xenografts / T. Schmoch, Z. Gal, A. Mock, J. Mossemann, B. Lahrmann, N. Grabe, P. Schmezer, F. Lasitschka, P. Beckhove, A. Unterberg, C. Herold-Mende // *Anticancer Research*. – 2016. – Vol.36. – №4. – P.1489-1496.

191. Schug, T.T. Opposing Effects of Retinoic Acid on Cell Growth Result from Alternate Activation of Two Different Nuclear Receptors / T.T. Schug, D.C. Berry, N.S. Shaw, S.N. Travis, N. Noy // *Cell*. – 2007. – Vol.129. – №4. – P.723-733.

192. Seewaldt, V.L. Expression of retinoic acid receptor β mediates retinoic acid-induced growth arrest and apoptosis in breast cancer cells / V.L. Seewaldt, B.S. Johnson, M.B. Parker, S.J. Collins, K. Swisshelm // *Cell Growth and Differentiation*. – 1995. – Vol.6. – №9. – P.1077-1088.

193. Sessler, R.J. A ligand-activated nuclear localization signal in cellular retinoic acid binding protein-II / R.J. Sessler, N. Noy // *Molecular Cell*. – 2005. – Vol.18. – №3. – P.343-353.

194. Shaw, N. Retinoic Acid is a High Affinity Selective Ligand for the Peroxisome Proliferator-activated Receptor β/δ / N. Shaw, M. Elholm, N. Noy // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – Vol.278. – №43. – P.41589-41592.

195. Siddikuzzaman. All trans retinoic acid and cancer / Siddikuzzaman, C. Guruvayoorappan, V.M. Berlin Grace // *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. – 2011. – Vol.33. – №2. – P.241-

249.

196. Sirchia, S.M. Evidence of epigenetic changes affecting the chromatin state of the retinoic acid receptor $\beta 2$ promoter in breast cancer cells / S.M. Sirchia, A.T. Ferguson, E. Sironi, S. Subramanyan, R. Orlandi, S. Sukumar, N. Sacchi // *Oncogene*. – 2000. – Vol.19. – №12. – P.1556-1563.

197. Sirchia, S.M. Endogenous reactivation of the RAR $\beta 2$ tumor suppressor gene epigenetically silenced in breast cancer / S.M. Sirchia, M. Ren, R. Pili, E. Sironi, G. Somenzi, R. Ghidoni, S. Toma, G. Nicolò, N. Sacchi // *Cancer Research*. – 2002. – Vol.62. – №9. – P.2455-2461.

198. Solis, G.P. Reggie/flotillin proteins are organized into stable tetramers in membrane microdomains / G.P. Solis, M. Hoegg, C. Munderloh, Y. Schrock, E. Malaga-Trillo, E. Rivera-Milla, C.A.O. Stuermer // *Biochemical Journal*. – 2007. – Vol.403. – №2. – P.313-322.

199. Soprano, D.R. Retinoic acid receptors and cancers / D.R. Soprano, P. Qin, K.J. Soprano // *Annual Review of Nutrition*. – 2004. – Vol.24. – №1. – P.201-221.

200. Stevison, F. Role of Retinoic Acid-Metabolizing Cytochrome P450s, CYP26, in Inflammation and Cancer / F. Stevison, J. Jing, S. Tripathy, N. Isoherranen // *Advances in Pharmacology*. – 2015. – Vol.74. – P.373-412.

201. Surwit, E.A. Evaluation of topically applied trans-retinoic acid in the treatment of cervical intraepithelial lesions / E.A. Surwit, V. Graham, W. Droegemueller, D. Alberts, M. Chvapil, R.T. Dorr, J.R. Davis, F.L. Meyskens // *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. – 1982. – Vol.143. – №7. – P.821-823.

202. Sussman, F. Ligand recognition by RAR and RXR receptors: Binding and selectivity / F. Sussman, A.R. De Lera // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2005. – Vol.48. – №20. – P.6212-6219.

203. Swift, M.E. Truncated RAR beta isoform enhances proliferation and retinoid resistance / M.E. Swift, B. Wallden, E.A. Wayner, K. Swisshelm // *Journal of Cellular Physiology*. – 2006. – Vol.209. – №3. – P.718-725.

204. Tan, N.-S. Selective Cooperation between Fatty Acid Binding Proteins and Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in Regulating Transcription / N.-S. Tan, N.S. Shaw, N. Vinckenbosch, P. Liu, R. Yasmin, B. Desvergne, W. Wahli, N. Noy // *Molecular and Cellular Biology*. – 2002. – Vol.22. – №14. – P.5114-5127.

205. Tanaka, K. Frequent methylation-associated silencing of a candidate tumor-suppressor, CRABP1, in esophageal squamous-cell carcinoma / K. Tanaka, I. Imoto, J. Inoue, K. Kozaki, H. Tsuda, Y. Shimada, S. Aiko, Y. Yoshizumi, T. Iwai, T. Kawano, J. Inazawa // *Oncogene*. – 2007. – Vol.26. – №44. – P.6456-6468.

206. Tang, X.-H.H. Overexpression of CRABPI in suprabasal keratinocytes enhances the proliferation of epidermal basal keratinocytes in mouse skin topically treated with all-trans retinoic

acid / X.-H.H. Tang, M. Vivero, L.J. Gudas // *Experimental Cell Research*. – 2008. – Vol.314. – №1. – P.38-51.

207. Tang, X.H. Retinoids, retinoic acid receptors, and cancer / X.H. Tang, L.J. Gudas // *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. – 2011. – Vol.6. – P.345-364.

208. Tari, A.M. Her2/neu induces all-trans retinoic acid (ATRA) resistance in breast cancer cells / A.M. Tari, S.J. Lim, M.C. Hung, F.J. Esteva, G. Lopez-Berestein // *Oncogene*. – 2002. – Vol.21. – №34. – P.5224-5232.

209. Tchevkina, E.M. Retinoic Acid Binding Proteins and Cancer: Similarity or Polarity? / E.M. Tchevkina // *Cancer therapy & Oncology International Journal*. – 2017. – Vol.8. – №2.

210. Thakur, A.K. Local and non-local topological information in the denatured state ensemble of a β -barrel protein / A.K. Thakur, W. Meng, L.M. Gierasch // *Protein Science*. – 2018. – Vol.27. – №12. – P.2062-2072.

211. The, H. De. Identification of a retinoic acid responsive element in the retinoic acid receptor β gene / H. De The, M. Del Mar Vivanco-Ruiz, P. Tiollais, H. Stunnenberg, A. Dejean // *Nature*. – 1990. – Vol.343. – №6254. – P.177-180.

212. Theodosiou, M. From carrot to clinic: An overview of the retinoic acid signaling pathway / M. Theodosiou, V. Laudet, M. Schubert // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2010. – Vol.67. – №9. – P.1423-1445.

213. Touma, S.E. Retinoid metabolism and ALDH1A2 (RALDH2) expression are altered in the transgenic adenocarcinoma mouse prostate model / S.E. Touma, S. Perner, M.A. Rubin, D.M. Nanus, L.J. Gudas // *Biochemical Pharmacology*. – 2009. – Vol.78. – №9. – P.1127-1138.

214. Treuting, P.M. Retinoic acid receptor β 2 inhibition of metastasis in mouse mammary gland xenografts / P.M. Treuting, L.I. Chen, B.S. Buetow, W. Zeng, T.A. Birkebak, V.L. Seewaldt, K.M. Sommer, M. Emond, L. Maggio-Price, K. Swisshelm // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2002. – Vol.72. – №1. – P.79-88.

215. Tsibris, J.C.M. Insights from gene arrays on the development and growth regulation of uterine leiomyomata / J.C.M. Tsibris, J. Segars, D. Coppola, S. Mane, G.D. Wilbanks, W.F. O'Brien, W.N. Spellacy // *Fertility and Sterility*. – 2002. – Vol.78. – №1. – P.114-121.

216. Tsonis, P.A. Role of retinoic acid in lens regeneration / P.A. Tsonis, M.T. Trombley, T. Rowland, R.A.S. Chandraratna, K. Del Rio-Tsonis // *Developmental Dynamics*. – 2000. – Vol.219. – №4. – P.588-593.

217. Um, S.J. Negative regulation of $ERR\alpha$ by a novel nucleolar protein / S.J. Um, H.S. Youn, E.J. Kim // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2012. – Vol.418. – №2. – P.290-295.

218. Vaessen, M.J. The cellular retinoic-acid-binding protein is expressed in tissues associated

with retinoic-acid-induced malformations / M.J. Vaessen, J.H.C. Meijers, D. Bootsma, G. Van Kessel // *Development*. – 1990. – Vol.110. – №2. – P.371-378.

219. Vahlquist, A. Increased concentrations of 3,4-didehydroretinol and retinoic acid-binding protein (CRABPII) in human squamous cell carcinoma and keratoacanthoma but not in basal cell carcinoma of the skin / A. Vahlquist, E. Andersson, B.I. Coble, O. Rollman, H. Törmä // *Journal of Investigative Dermatology*. – 1996. – Vol.106. – №5. – P.1070-1074.

220. Vee, M. Le. Differential regulation of drug transporter expression by all-trans retinoic acid in hepatoma HepaRG cells and human hepatocytes / M. Le Vee, E. Jouan, B. Stieger, O. Fardel // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2013. – Vol.48. – №4-5. – P.767-774.

221. Veerkamp, J.H. Cytoplasmic fatty acid-binding proteins: Their structure and genes / J.H. Veerkamp, R.G.H.J. Maatman // *Progress in Lipid Research*. – 1995. – Vol.34. – №1. – P.17-52.

222. Vo, H.P. Transcriptional regulation of retinoic acid responsive genes by cellular retinoic acid binding Protein-II modulates RA mediated tumor cell proliferation and invasion / H.P. Vo, D.L. Crowe // *Anticancer Research*. – 1998. – Vol.18. – №1 A. – P.217-224.

223. Vreeland, A.C. Cellular retinoic acid-binding protein 2 inhibits tumor growth by two distinct mechanisms / A.C. Vreeland, L. Levi, W. Zhang, D.C. Berry, N. Noy // *Journal of Biological Chemistry*. – 2014. – Vol.289. – №49. – P.34065-34073.

224. Vreeland, A.C. Transcript Stabilization by the RNA-Binding Protein HuR Is Regulated by Cellular Retinoic Acid-Binding Protein 2 / A.C. Vreeland, S. Yu, L. Levi, D. de Barros Rossetto, N. Noy // *Molecular and Cellular Biology*. – 2014. – Vol.34. – №12. – P.2135-2146.

225. Walter, R.F.H. Methylation of L1RE1, RARB, and RASSF1 function as possible biomarkers for the differential diagnosis of lung cancer / R.F.H. Walter, P. Rozynek, S. Casjens, R. Werner, F.D. Mairinger, E.J.M. Speel, A. Zur Hausen, S. Meier, J. Wohlschlaeger, D. Theegarten, T. Behrens, K.W. Schmid, T. Brüning, G. Johnen // *PLoS ONE*. – 2018. – Vol.13. – №5. – P.e0195716.

226. Wang, F. Differential DNA methylation status between breast carcinomatous and normal tissues / F. Wang, Y. Yang, Z. Fu, N. Xu, F. Chen, H. Yin, X. Lu, R. Shen, C. Lu // *Biomedicine and Pharmacotherapy*. – 2014. – Vol.68. – №6. – P.699-707.

227. Wang, J. Multiple functions of the RNA-binding protein HuR in cancer progression, treatment responses and prognosis / J. Wang, Y. Guo, H. Chu, Y. Guan, J. Bi, B. Wang // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2013. – Vol.14. – №5. – P.10015-10041.

228. Wang, Z.Y. Acute promyelocytic leukemia: From highly fatal to highly curable / Z.Y. Wang, Z. Chen // *Blood*. – 2008. – Vol.111. – №5. – P.2505-2515.

229. Whitet, J.A. Identification of the retinoic acid-inducible all-trans-retinoic acid 4-hydroxylase / J.A. Whitet, Y.D. Guo, K. Baetz, B. Beckett-Jones, J. Bonasoro, K.E. Hsu, F.J. Dilworth, G. Jones, M. Petkovich // *Journal of Biological Chemistry*. – 1996. – Vol.271. – №47. – P.29922-

29927.

230. Widschwendter, M. Loss of retinoic acid receptor β expression in breast cancer and morphologically normal adjacent tissue but not in the normal breast tissue distant from the cancer / M. Widschwendter, J. Berger, G. Daxenbichler, E. Müller-Holzner, A. Widschwendter, A. Mayr, C. Marth, A.G. Zeimet // *Cancer Research*. – 1997. – Vol.57. – №19. – P.4158-4161.

231. Won, J.Y. The effect of cellular retinoic acid binding protein-I expression on the CYP26-mediated catabolism of all-trans retinoic acid and cell proliferation in head and neck squamous cell carcinoma / J.Y. Won, E.C. Nam, S.J. Yoo, H.J. Kwon, S.J. Um, H.S. Han, S.H. Kim, Y. Byun, S.Y. Kim // *Metabolism: Clinical and Experimental*. – 2004. – Vol.53. – №8. – P.1007-1012.

232. Wongwarangkana, C. Retinoic acid receptor beta promoter methylation and risk of cervical cancer / C. Wongwarangkana, N. Wanlapakorn, J. Chansaenroj, Y. Poovorawan // *World Journal of Virology*. – 2018. – Vol.7. – №1. – P.1-9.

233. Wook Park, S. A new regulatory mechanism for Raf kinase activation, retinoic acid-bound Crabp1 / S. Wook Park, J. Nhieu, S.D. Persaud, M.C. Miller, Y. Xia, Y.W. Lin, Y.L. Lin, H. Kagechika, K.H. Mayo, L.N. Wei // *Scientific Reports*. – 2019. – Vol.9. – №1. – P.10929.

234. Wu, Q. Anticancer effect of retinoic acid via AP-1 activity repression is mediated by retinoic acid receptor α and β in gastric cancer cells / Q. Wu, Z.M. Chen, W.J. Su // *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. – 2002. – Vol.34. – №9. – P.1102-1114.

235. Wu, Q. DNA methylation profiling of ovarian carcinomas and their in vitro models identifies HOXA9, HOXB5, SCGB3A1, and CRABP1 as novel targets / Q. Wu, R.A. Lothe, T. Ahlquist, I. Silins, C.G. Tropé, F. Micci, J.M. Nesland, Z. Suo, G.E. Lind // *Molecular Cancer*. – 2007. – Vol.6. – №45.

236. Wu, S. All-trans-retinoic acid blocks cell cycle progression of human ovarian adenocarcinoma cells at late G1 / S. Wu, A. Donigan, C.D. Platsoucas, W. Jung, D.R. Soprano, K.J. Soprano // *Experimental Cell Research*. – 1997. – Vol.232. – №2. – P.277-286.

237. Wu, X. Identification of genes with higher expression in human uterine leiomyomas than in the corresponding myometrium / X. Wu, A. Blanck, G. Norstedt, L. Sahlin, A. Flores-Morales // *Molecular Human Reproduction*. – 2002. – Vol.8. – №3. – P.246-254.

238. Xu, X.C. Expression and up-regulation of retinoic acid receptor- β is associated with retinoid sensitivity and colony formation in esophageal cancer cell lines / X.C. Xu, X. Liu, E. Tahara, S.M. Lippman, R. Lotan // *Cancer Research*. – 1999. – Vol.59. – №10. – P.2477-2483.

239. Yang, Q. Retinoid, retinoic acid receptor β and breast cancer / Q. Yang, T. Sakurai, K. Kakudo // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2002. – Vol.76. – №2. – P.167-173.

240. Yang, Q. Cellular retinoic acid binding protein 2 is strikingly downregulated in human esophageal squamous cell carcinoma and functions as a tumor suppressor / Q. Yang, R. Wang, W.

Xiao, F. Sun, H. Yuan, Q. Pan // PLoS ONE. – 2016. – Vol.11. – №2. – P.e0148381.

241. Yao, W. All-trans retinoic acid reduces cancer stem cell-like cell-mediated resistance to gefitinib in NSCLC adenocarcinoma cells / W. Yao, L. Wang, H. Huang, X. Li, P. Wang, K. Mi, J. Cheng, H. Liu, C. Gu, L. Huang, J. Huang // BMC Cancer. – 2020. – Vol.20. – №1. – P.315.

242. Yari, K. Promoter methylation status of the retinoic acid receptor-beta 2 gene in breast cancer patients: A case control study and systematic review / K. Yari, Z. Rahimi // Breast Care. – 2019. – Vol.14. – №2. – P.117-123.

243. Yilmaz, M. Acute promyelocytic leukemia current treatment algorithms / M. Yilmaz, H. Kantarjian, F. Ravandi // Blood Cancer Journal. – 2021. – Vol.11. – №6. – P.123.

244. Youn, H. RaRF confers RA resistance by sequestering RAR to the nucleolus and regulating MCL1 in leukemia cells / H. Youn, H.K. Lee, H.R. Sohn, U.H. Park, E.J. Kim, B. Youn, S.J. Um // Oncogene. – 2018. – Vol.37. – №3. – P.352-362.

245. Zhang, H. Expression profiles of p53, p21, bax and bcl-2 proteins in all-trans-retinoic acid treated primary and metastatic melanoma cells. / H. Zhang, I. Rosdahl // International journal of oncology. – 2004. – Vol.25. – №2. – P.303-308.

246. Zhang, W. Kruppel-like factor 2 suppresses mammary carcinoma growth by regulating retinoic acid signaling / W. Zhang, L. Levi, P. Banerjee, M. Jain, N. Noy // Oncotarget. – 2015. – Vol.6. – №34. – P.35830-35842.

247. Zhang, W. RNA-binding protein HuR regulates nuclear import of protein / W. Zhang, A.C. Vreeland, N. Noy // Journal of Cell Science. – 2016. – Vol.129. – №21. – P.4025-4033.

248. Zhang, X. Current views on the genetic landscape and management of variant acute promyelocytic leukemia / X. Zhang, J. Sun, W. Yu, J. Jin // Biomarker Research. – 2021. – Vol.9. – №1. – P.33.

249. Zhang, X.K. Retinoid receptors in human lung cancer and breast cancer / X.K. Zhang, Y. Liu, M.O. Lee // Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. – 1996. – Vol.350. – №1. – P.267-277.

250. Zhao, Y. Abnormal methylation of seven genes and their associations with clinical characteristics in early stage non-small cell lung cancer / Y. Zhao, H. Zhou, K. Ma, J. Sun, X. Feng, J. Geng, J. Gu, W. Wang, H. Zhang, Y. He, S. Guo, X. Zhou, J. Yu, Q. Lin // Oncology Letters. – 2013. – Vol.5. – №4. – P.1211-1218.

251. Zheng, C. Maprotiline Suppresses Cholesterol Biosynthesis and Hepatocellular Carcinoma Progression Through Direct Targeting of CRABP1 / C. Zheng, Y. Zhu, Q. Liu, T. Luo, W. Xu // Frontiers in Pharmacology. – 2021. – Vol.12. – P.689767.

252. Zhou, D.C. Constitutive expression of cellular retinoic acid binding protein II and lack of correlation with sensitivity to all-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia cells / D.C. Zhou,

S.J. Hallam, S.J. Lee, R.S. Klein, P.H. Wiernik, M.S. Tallman, R.E. Gallagher // *Cancer Research*. – 1998. – Vol.58. – №24. – P.5770-5776.

253. Zouboulis, C.C. Chronological ageing and photoageing of the human sebaceous gland / C.C. Zouboulis, A. Boschnakow // *Clinical and Experimental Dermatology*. – 2001. – Vol.26. – №7. – P.600-607.

254. Zuccari, G. Modified polyvinylalcohol for encapsulation of all-trans-retinoic acid in polymeric micelles / G. Zuccari, R. Carosio, A. Fini, P.G. Montaldo, I. Orienti // *Journal of Controlled Release*. – 2005. – Vol.103. – №2. – P.369-380.

255. Rossetti, S. 3D Mammary Epithelial Cell Models: A Goldmine of DCIS Biomarkers and Morphogenetic Mechanisms. / S. Rossetti, N. Sacchi // *Cancers*. – 2019. – T.11. – №2.