БИОХИМИЯ, 2021, том 86, вып. 2, с. 259 – 273

УДК 576.52, 576.54

УРОВНИ БЕЛКОВ CRABP1 И CRABP2 НЕ КОРРЕЛИРУЮТ С ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ К РЕТИНОЕВОЙ КИСЛОТЕ, НО КОРРЕЛИРУЮТ МЕЖДУ СОБОЙ, ПРИЧЕМ CRABP2 ЯВЛЯЕТСЯ РЕГУЛЯТОРОМ ПРОДУКЦИИ CRABP1*

© 2021 А.Д. Еникеев, А.В. Комельков, М.Е. Аксельрод, С.А. Галецкий, С.А. Кузьмичев, Е.М. Чевкина**

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478 Москва, Россия; электронная почта: komelkov@gmail.com

Поступила в редакцию 17.08.2020
После доработки 30.09.2020
Принята к публикации 30.09.2020

Белки, связывающие ретиноевую кислоту (РК), CRABP1 и CRABP2 являются молекулярными шаперонами, обеспечивающими реализацию внутриклеточной активности РК, важнейшего стимулятора клеточной дифференцировки, обладающего опухоль-супрессорной активностью. Одной из основных функций CRABP2 является доставка и передача ретиноевой кислоты ядерным рецепторам RAR/RXR, что приводит к активации транскрипции широкого спектра ретиноид-респонсивных генов. Функции CRABP1 менее изучены, но связаны, по-видимому, с удержанием ретиноевой кислоты в цитоплазме и ограничением ее активности в отношении регуляции транскрипции генов, что предполагает участие данного белка в формировании РК-резистентности. Также малопонятны и механизмы, регулирующие активность CRABP1. Впервые проведенное в данной работе сравнение уровней CRABP1 в линиях опухолевых клеток различного происхождения показало отсутствие этого белка в клетках опухолей, считающихся РК-резистентными, и его выраженную продукцию в РК-чувствительных клетках. Вместе с тем анализ, проведенный на панели клеточных линий рака молочной железы с различным уровнем РК-чувствительности, показал отсутствие корреляции продукции белка CRABP1 с чувствительностью клеток к ретиноевой кислоте. При этом впервые обнаружена корреляция продукции белков CRABP1 и CRABP2 во всех исследованных типах клеток, вне зависимости от их происхождения и РК-чувствительности/резистентности. Более того, впервые показано, что нокдаун гена *CRABP2* приводит к подавлению продукции белка CRABP1 как в РК-чувствительных, так и в РК-резистентных клетках. Обнаруженная нами CRABP2-зависимая регуляция уровня CRABP1 является новым механизмом внутриклеточной ретиноевой сигнальной системы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ретиноевая кислота, ATRA, CRABP1, CRABP2, пролиферация, регуляция экспрессии.

DOI: 10.31857/S032097252102010X

ВВЕДЕНИЕ

Ретиноевая кислота (РК) является одним из наиболее активных внутриклеточных метаболитов ретинола (витамина А). Функциональная активность РК связана с регуляцией транскрипции более пяти сотен генов, в промоторной области которых имеются ретиноид-респонсивные элементы (RARE). Она реализуется с помощью ядерных рецепторов РК, прежде всего белков RAR (RARα, β и γ) и RXR, которые функционируют в качестве транскрипционных факторов в составе гетеродимеров, а также рецептора PPARβ/δ, также образующего гетеродимер с RXR [1]. За счет способности контролировать транскрипционную активность ряда генов РК регулирует важнейшие биологические процессы, связанные с дифференцировкой клеток, ремоделированием тканей и иммунным ответом. В большинстве клеток РК стимулирует дифференцировку или апоптоз и даже является негативным регулятором пролиферации, в связи с чем ее принято считать опухолевым супрес-

Принятые сокращения: НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого; РК – ретиноевая кислота; РМЖ – рак молочной железы; ATRA – полностью транс-ретиноевая кислота (all-trans retinoic acid); CRABP1 и CRABP2 – белки, связывающие ретиноевую кислоту, 1 и 2 (cellular retinoic acid-binding proteins 1 and 2); FABP5 – белок, связывающий жирные кислоты (fatty acid-binding protein); GFP – зеленый флуоресцентный белок (green fluorescent protein); PPAR – рецепторы, активируемые пролифераторами пероксисом (peroxisome proliferator-activated receptors); RAR – рецептор ретиноевой кислоты (retinoic acid receptor).

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya в рубрике «Papers in Press», BM20-267, 25.01.2021.

** Адресат для корреспонденции.

сором. В этой связи предпринимаются активные попытки разработки препаратов для терапии опухолей на основе РК и ее синтетических аналогов, однако до сих пор применение ретиноидов в клинической практике ограничено (за исключением острого промиелоцитарного лейкоза) прежде всего быстрым приобретением злокачественными клетками устойчивости к терапии на основе производных или синтетических ретиноидов [2].

Реализация функциональной активности РК во многом определяется ее доставкой к ядерным рецепторам. За внутриклеточный транспорт гидрофобных молекул РК к рецепторам отвечают представители семейства липид-связывающих белков, прежде всего два белка, связывающих РК, CRABP1 и CRABP2 (cellular retinoic acid-binding proteins 1 and 2), а также представитель семейства белков, связывающих жирные кислоты, FABP5 (fatty acid-binding protein 5) [3]. Согласно некоторым данным, белки CRABP в целом (или как минимум CRABP2) обеспечивают взаимодействие РК с рецепторами RAR/RXR, в то время как FABP5 доставляет РК к рецептору PPARβ/δ. Предполагается, что взаимодействие РК с разными ядерными рецепторами приводит к противоположному эффекту на клетки: CRABP2-зависимая активация RAR/RXR способствует стимуляции дифференцировки и реализации проапоптотической и антипролиферативной активности РК, в то время как опосредуемое FABP5 взаимодействие РК с PPARβ/δ способствует активации транскрипции генов, ответственных за выживание, пролиферацию и ангиогенез [4]. Аффинность РК к белкам CRABP выше, чем к FABP5 [5], кроме того, в большинстве клеток соотношение уровня экспрессии белков CRABP2/FABP5 и RAR/PPARβ/δ сдвинуто в сторону CRABP–RAR пути, что определяет опухоль-супрессорную функцию РК в большинстве типов тканей [6]. Существуют данные, указывающие на то, что увеличение соотношения FABP5/CRABP2 коррелирует с устойчивостью клеток к РК [7, 8]. В связи с описанной функцией CRABP2 его принято считать опухолевым супрессором. Более того, для него показана активность в цитоплазме в отсутствие РК, не связанная с активацией ее рецепторов, которая также способствует остановке клеточного цикла и стабилизации транскриптов проапоптотических генов [9, 10]. При этом в некоторых типах опухолей CRABP2 играет, по-видимому, опухоль-промоторную роль [11, 12], однако механизмы такой активности остаются малопонятными. Косвенно на участие FABP5 в РК-резистентности указывают и результаты исследования рака молочной железы (РМЖ), которые показали, что FABP5 преимущественно экспрессируется в ER-негативных (абб. ER от англ. estrogen negative) и трижды-негативных опухолях, которые обычно демонстрируют РК-резистентность [8]. Наибольшей аффинностью к РК среди РК-связывающих белков обладает белок CRABP1 [13], однако о его функциональном значении известно очень мало, а данные о его роли в трансформации клеток и опухолевой прогрессии еще более противоречивы.

Предположительно, связывание CRABP1 с РК приводит к удержанию ее в цитоплазме [14], ограничению активности (включая доступ РК к белку CRABP2 по конкурентному механизму [15]), и даже может способствовать метаболизму РК [16–18]. В соответствии с этим можно сделать предположение о роли CRABP1 в приобретении клетками устойчивости к РК. Однако за исключением единственной работы, где показано увеличение экспрессии CRABP1 в ER/PR-негативных (абб. PR от англ. progesterone negative) опухолях молочной железы [15], исследований о связи данного белка с чувствительностью к РК нам не известно. По другим данным, CRABP1 обладает схожими с CRABP2 функциями – он также направляет РК к рецепторам RAR, однако не взаимодействует с ними напрямую, передаче РК рецептору предшествует диссоциация комплекса РК–CRABP1 [13]. В этой связи остается непонятной функция этого белка в ядре, хотя он, как и CRABP2, имеет сигнал ядерной локализации, а присутствие CRABP1 в ядре подтверждается как нашими предшествующими исследованиями [19], так и данными литературы [20].

О возможной взаиморегуляции белков CRABP в настоящее время ничего не известно, хотя ее наличие кажется достаточно вероятным, учитывая то, что оба белка обеспечивают реализацию сходных РК-регулируемых процессов и сами, в свою очередь, являются продуктами экспрессии ретиноид-зависимых генов. На такую возможность указывают и полученные нами ранее данные [21].

Тем не менее среди достаточно многочисленных исследований РК-связывающих белков, за исключением цитируемой выше работы по изучению функций CRABP1/2 при раке молочной железы [15] и нашей работы, выполненной на образцах немелкоклеточного рака легкого [21], практически отсутствуют исследования, в которых анализировались бы одновременно белки CRABP1 и CRABP2.

В данной работе мы впервые исследовали экспрессию обоих гомологов CRABP на широкой панели клеточных линий и проанализирова-

ли их возможную связь с чувствительностью/резистентностью клеток к РК. Мы не выявили строгой ассоциации между продукцией исследуемых белков и РК-чувствительностью, хотя большинство РК-чувствительных линий характеризовалось высоким уровнем CRABP1/2, а наиболее РК-резистентные линии демонстрировали отсутствие указанных белков. При этом была обнаружена корреляция между продукцией CRABP1 и CRABP2 – все линии, в которых экспрессируется CRABP1, характеризуются высоким уровнем продукции CRABP2, в то время как во всех линиях клеток с низким уровнем или отсутствием CRABP2 продукция CRABP1 не регистрируется. Более того, впервые было показано, что экспрессия белков CRABP имеет функциональную связь, в которой CRABP2 является регулятором продукции CRABP1.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные линии. Были использованы следующие линии клеток из коллекции ATCC: немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) – A549, H1299, H460; глиобластомы – LN229 и U87; рака яичника – OVCAR-8, SK-OV-3, EFO-21; нейробластомы – SK-N-AS, SH-SY-5Y, IMR-32; рака молочной железы (РМЖ) – MCF7, T47D, SKBR3, HCC1954, MDA-MB-453, HCC1937, MDA-MB-468, MDA-MB-231, HBL100. Для получения псевдоретровирусных частиц использовались линии эпителиальных клеток 293FT («Invitrogen», США) и GP293 («Clontech», США). Клетки культивировали в среде DMEM («ПанЭко», Россия), содержащей 0,294 мг/мл L-глутамина, 10% эмбриональной телячьей сыворотки («PAA Laboratories», Канада), 0,1 мг/мл стрептомицина, 100 ед/мл пенициллина при 37 °C и 5% CO_2. Клетки MCF10A эпителия молочной железы культивировали в среде DMEM/F-12 («Gibco», США), содержащей 5% лошадиной сыворотки («Gibco», США), 20 нг/мл ростового фактора EGF («Thermo Fisher Scientific», США), 0,5 мг/мл гидрокортизона («Sigma-Aldrich», США), 100 нг/мл холерного токсина («Sigma-Aldrich», США) и 10 мкг/мл инсулина («Sigma-Aldrich», США). Отсутствие контаминации микоплазмой проверяли стандартными методами, ПЦР и окрашиванием Hoechst 33342 («Thermo Fisher Scientific», США).

Анализ чувствительности клеток к ретиноевой кислоте. Полностью транс-ретиноевую кислоту (абб. ATRA от англ. all-trans retinoic acid) растворяли в ДМСО для приготовления стокового раствора с концентрацией 10 мМ. Клетки высаживали в количестве 50–300 тысяч на 60-мм чашки Петри («SPL Life Sciences», США) в зависимости от клеточной линии и культивировали в течение 5 сут в присутствии ATRA в диапазоне концентраций 0,1–100 мкМ. Снимали клетки 0,25%-ным раствором трипсин-ЭДТА, смешивали с красителем трипановый синий в соотношении 1 : 1 и подсчитывали в камере Горяева. В качестве контроля для каждой линии использовали клетки, культивируемые параллельно в течение того же времени в среде без ATRA, содержащей ДМСО в соответствующей концентрации. Количество живых клеток в контроле для каждой линии брали за 100%.

Получение производных линий клеток с гиперэкспрессией экзогенного CRABP1. Молекулярное клонирование и ретровирусную инфекцию проводили по описанной ранее методике [22]. Кодирующая последовательность *CRABP1* была амплифицирована с помощью ПЦР с использованием праймеров к последовательностям, фланкирующим кодирующую область мРНК *CRABP1*:

CRABP1 cloning F: 5′ ATT*CTCGAG*CCACCATGCCCAACTTC 3′ и
CRABP1 cloning R: 5′ ACAGGATCCCTGCCTTCACTCTCGG 3′

(сайты рестрикции выделены курсивом, комплементарные мРНК последовательности подчеркнуты). Матрицей для ПЦР служила кДНК, синтезированная с мРНК, выделенной из ткани рака легкого человека. Амплификацию проводили в присутствии высокоточной полимеразы PFX («Invitrogen», США) согласно протоколу производителя. Кодирующая последовательность была клонирована в ретровирусный вектор pLXSN («Clontech», США) по сайтам рестрикции XhoI и BamHI. Проверку осуществляли с помощью рестрикции полученных конструктов, а также методом ПЦР с помощью следующих праймеров:

pLXSN F: 5′ CCCTTGAACCTCCTCGTTCG 3′ и
pLXSN R: 5′ TTTCCACACCTGGTTGCTGA 3′,

подобранных к участкам вектора, фланкирующим вставку. Соответствие последовательности *CRABP1* человека подтверждали с помощью секвенирования. Псевдоретровирусные частицы получали с помощью трансфекции клеток GP293. Для трансфекции брали 2 мкг ДНК смеси pLXSN-CRABP1 и pVSV-G («Clontech», США) в эквимолярном соотношении. Трансфекцию проводили с использованием липофектамина 2000 («Invitrogen», США) согласно про-

токолу производителя. По достижении 20–30% конфлюэнтности клеток добавляли 24, 48 и 72-часовые инокуляты вируса, смешанные со средой в соотношении 1 : 1, с добавлением 8 мкг/мл полибрена («Sigma-Aldrich», США). Селекцию проводили на G418 («Sigma-Aldrich», США) в концентрации 1000 мкг/мл в течение 8–9 дней. Для контрольных экспериментов получали производные тех же линий, в которые трансдуцировали не содержащий вставки вектор pLXSN.

Получение производных линий клеток с нокдауном *CRABP2*. Предшественники малых шпилечных РНК (shRNA) к кодирующей последовательности *CRABP2* были клонированы в лентивирусный вектор pLKO.1 puro («Addgene», США) по сайтам рестрикции AgeI и EcoRI. Последовательности:

sh1CRABP2: 5′ CCGGGAAATGGGAGAGTGAGAATAACTCGAGTTATTCTCACTCTCCCATTTCTTTTTG 3′ (TRCN0000021371),

sh2CRABP2: 5′ CCGGCGAGGAATTGCTCAAAGTGCTCTCGAGAGCACTTTGAGCAATTCCTCGTTTTTG 3′ (TRCN0000021370)

(смысловая и антисмысловая последовательности подчеркнуты). Результаты проверяли с помощью ПЦР с использованием праймеров pLKO.1-seq standart и с помощью секвенирования (ID последовательности AH002814.2, Homo sapiens retinoic acid-binding protein II (CRABP-II) gene, complete cds, доступна по адресу https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AH002814.2).

Для получения псевдоретровирусных частиц использовали клетки 293FT при 70% конфлюэнтности. Для трансфекции брали 2 мкг ДНК смеси векторов pLKO.1 puro, pVSVG («Clontech», США) и pCMV delta R8.2 («Addgene», США) в эквимолярном соотношении. Трансфекцию проводили с использованием липофектамина 2000 («Invitrogen», США), согласно протоколу производителя. По достижении 20–30% конфлюэнтности клеток добавляли 24, 48 и 72-часовые инокуляты вируса, смешанные со средой в соотношении 1 : 1, с добавлением 8 мкг/мл полибрена («Sigma-Aldrich», США). Селекцию проводили на пуромицине («Sigma-Aldrich», США) в концентрации 1–2 мкг/мл в зависимости от клеточной линии в течение 4–5 дней. Для контрольных экспериментов получали производные тех же линий, экспрессирующие shRNA к зеленому флуоресцентному белку (shGFP).

Иммуноблоттинг. Иммуноблоттинг проводили по описанной ранее методике [22]. Клетки лизировали в буфере RIPA (50 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 150 мМ NaCl, 0,5% DoX, 1% NP-40, 0,1% SDS, 2 мМ ЭДТА) с добавлением смеси ингибиторов протеаз Complete Protease Inhibitor Cocktail («Roche», Швейцария). Концентрацию белка определяли методом Бредфорда с помощью набора Bradford Assay Kit («Bio-Rad», США). Белок в количестве 15 мкг разделяли в 15%-ном полиакриламидном геле, переносили на PVDF мембрану («Millipore», США). Мембрану инкубировали в блокирующем растворе 5%-ного BSA («PAA Laboratories GmbH», Австрия) в буфере TBS, содержащем 0,1% TWEEN 20 («Sigma-Aldrich», США). Затем мембрану инкубировали первичными антителами к CRABP1 («Sigma-Aldrich», США, HPA17203; 1 : 1000) или CRABP2 («Sigma-Aldrich», США, HPA004135; 1 : 500) 12 ч при +4 °C. В качестве контроля нанесения белка использовали антитела к β-актину («Abcam», Великобритания, ab8227; 1 : 5000). После стандартной отмывки мембрану инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена («Cell Signaling Technology», США, 29902; 1 : 65 000) 1 ч при комнатной температуре. После отмывки мембрану проявляли с помощью реагента ECL (Enhanced Chemiluminescence, «Millipore», США). Хемилюминесцентную реакцию регистрировали на приборе Kodak Gel Logic 2200 Imaging System с последующей обработкой с помощью программы Carestream Molecular Imaging Software SE ver. 5.0.1.27.

Статистический анализ. Все данные были получены в результате трех независимых экспериментов. Данные представлены в виде среднего ± стандартного отклонения (SD). Для расчетов и построения графиков была использована программа GraphPad Prism 8.3 (GraphPad Software, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Продукция CRABP1 и CRABP2 коррелирует в клеточных линиях различного происхождения. Ранее в процессе изучения РК-связывающих белков мы обнаружили высокую вариабельность уровней CRABP (в особенности CRABP1) в линиях опухолевых клеток различного происхождения. Учитывая данные литературы о возможной роли CRABP1 в качестве внутриклеточного регулятора биодоступности РК, мы предположили, что этот белок может быть вовлечен в формирование РК-резистентности. В этой связи мы сравнили продукцию белков CRABP в различных типах опухолевых клеток. По резуль-

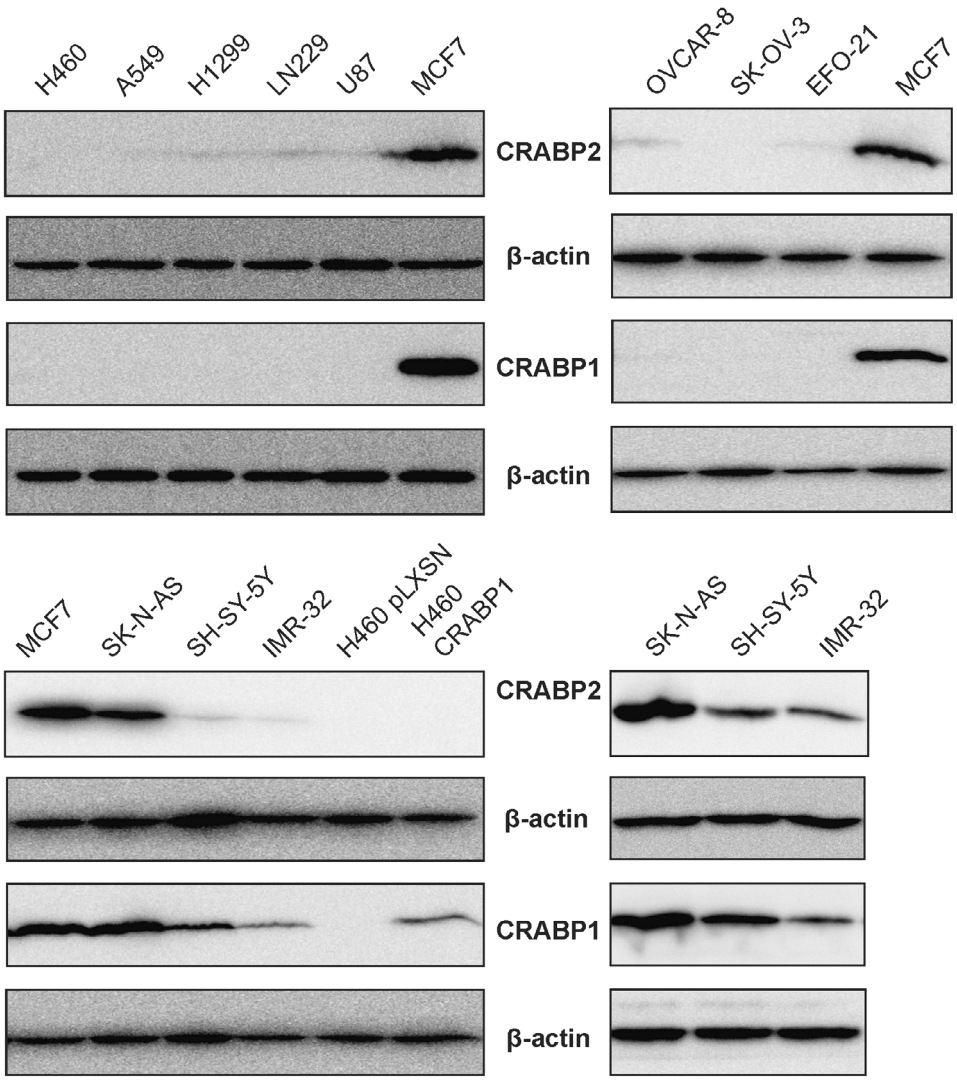


Рис. 1. Сравнение продукции белков CRABP1 и CRABP2 методом иммуноблоттинга в линиях опухолевых клеток различного происхождения: НМРЛ (H1299, A549, H460), рака яичника (OVCAR-8, SC-OV-3, EFO-21), глиобластомы (LN229, U87), нейробластомы (IMR-32, SK-N-AS, SH-SY-5Y). В качестве положительного контроля экспрессии CRABP1 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

татам анализа во всех линиях клеток НМРЛ (A549, H1299, H460), рака яичников (SK-OV-3, OVCAR-8, EFO-21) и глиобластомы (LN229, U87) мы наблюдали отсутствие белка CRABP1, в то время как во всех исследованных линиях нейробластомы (SK-N-AS, SH-SY-5Y, IMR-32) этот белок регистрировался на достаточно высоком уровне (рис. 1). В связи с тем, что в ряде клеточных линий белок CRABP1 не регистрировался, мы использовали линию MCF7 РМЖ в качестве положительного контроля наличия сигнала. Мы также обнаружили, что во всех клетках с экспрессией CRABP1 вне зависимости от их происхождения наблюдался высокий уровень CRABP2, в то время как в клетках с отсутствием экспрессии CRABP1 уровень CRABP2 был заметно снижен или белок не регистрировался. Для подтверждения специфичности работы используемых антител в отношении этих двух белков на рис. 1 представлены результаты анализа CRABP1 и CRABP2 в клетках исходной линии H460 в отсутствие эндогенной экспрессии CRABP1 и в ее производной сублинии с экспрессией экзогенного CRABP1 (H460

CRABP1), а также в контрольной линии, экспрессирующей вектор без вставки (H460 pLXSN). Как видно на рисунке, во всех производных сублиниях экспрессия белка CRABP2 не регистрировалась вне зависимости от экспрессии CRABP1, что подтверждает специфичность антител.

По данным литературы, НМРЛ, рак яичника и глиобластомы считаются в целом РК-резистентными, а нейробластомы – РК-чувствительными типами опухолей. Таким образом, наше предположение о связи РК-чувствительности клеток с экспрессией CRABP1 подтверждалось. На основании полученных данных мы также предположили наличие регуляторной связи между белками CRABP1 и CRABP2. Однако обе гипотезы необходимо было проверить, желательно с использованием клеточных линий сходного происхождения, но различающихся по чувствительности к РК.

Сравнение чувствительности к ретиноевой кислоте различных линий клеток рака молочной железы. Для проверки указанных гипотез была выбрана экспериментальная модель РМЖ. Во-первых, выбор обусловливался большим пулом преклинических данных, свидетельствующих о перспективах использования РК в качестве агента для профилактики и лечения данного типа опухолей [23–25]. Во-вторых, РМЖ является гетерогенным типом опухолей, как по происхождению, так и по молекулярным характеристикам, к которым относятся прежде всего экспрессия рецепторов эстрогена и прогестерона, а также статус HER2/neu. По данным литературы, чувствительность этих опухолей к РК также сильно варьирует [26, 27]. Различаются и данные в отношении уровня чувствительности к РК разных линий клеток РМЖ. Важно отметить, что в разных работах для оценки РК-чувствительности применяются различные подходы и методы оценки, а также значения концентрации РК. Поэтому на первом этапе необходимо было сравнить чувствительность к РК широкой панели клеточных линий РМЖ в единой серии экспериментов, выбрать условия и критерий (пороговое значение РК) для разделения линий на РК-чувствительные и РК-резистентные. В исследование включили 9 линий РМЖ, а также линию MCF10A, полученную из эпителия молочной железы, которая стандартно используется в качестве условно нормальной (нетуморогенной) линии клеток. Чувствительность к полностью транс-ретиноевой кислоте (наиболее распространенная в клетках и биологически активная изоформа РК) анализировали методом оценки динамики пролиферации. Для этого клетки каждой линии культивировали в течение 5 сут в стандартной среде (контроль) и в среде с ATRA в различных концентрациях, после чего проводили подсчет живых клеток. Диапазон концентраций ATRA варьировал от 0,1 до 100 мкМ. По результатам титрования ATRA и анализа количества живых клеток были выбраны пороговые концентрации ATRA и критерии, позволяющие разделить линии клеток на РК-чувствительные и РК-резистентные. РК-чувствительными считали линии, показавшие снижение пролиферации в два и более раза при инкубации с ATRA в концентрации до 10 мкМ. К этой группе относились линии MCF7, T47D, SKBR3 и HCC1954 (рис. 2, *а*). При этом чувствительность отдельных линий внутри группы варьировала – так, наиболее чувствительными оказались линии SKBR3 и T47D, которые продемонстрировали двукратное снижение пролиферации по сравнению с контролем даже при концентрации ATRA 0,1 мкМ. В то же время динамика пролиферации клеток в группе РК-резистентных линий (MDA-MB-453, MDA-MB-468, MDA-MB-231, HCC1937, HBL100, а также MCF10A) при добавлении 10 мкМ ATRA не менялась (рис. 2, *б*). Более того, количество живых клеток в этой группе линий не снижалось и при инкубации с ATRA в концентрации 20 мкМ. Тем не менее в группе РК-резистентных клеток можно было выделить линии, динамика пролиферации которых не менялась по сравнению с контролем даже при инкубации с 50 мкМ ATRA (HBL100, MDA-MB-231), и линии, для которых было характерно снижение пролиферации при данных условиях (MDA-MB-453, MDA-MB-468, HCC1937, MCF10A).

Это означает, что чувствительность к РК варьирует в достаточно широком диапазоне, однако порогом можно считать интервал концентраций 1–10 мкМ, при котором пролиферация РК-чувствительных клеток снижается в два и более раза по сравнению с контролем, в то время как пролиферация РК-резистентных клеток либо не меняется, либо начинает снижаться лишь при 50 мкМ ATRA – то есть, при концентрациях РК, значительно превышающих физиологические значения.

Продукция белков CRABP1 и CRABP2 в клетках РМЖ связана между собой, причем CRABP2 является регулятором CRABP1. Далее мы провели анализ продукции РК-связывающих белков CRABP1 и CRABP2 в РК-чувствительных и РК-резистентных линиях РМЖ. По результатам анализа мы не обнаружили достоверной ассоциации между экспрессией CRABP1 и РК-чувствительностью. Так, в РК-чувствительной линии SKBR3 продукция CRABP1 отсут-

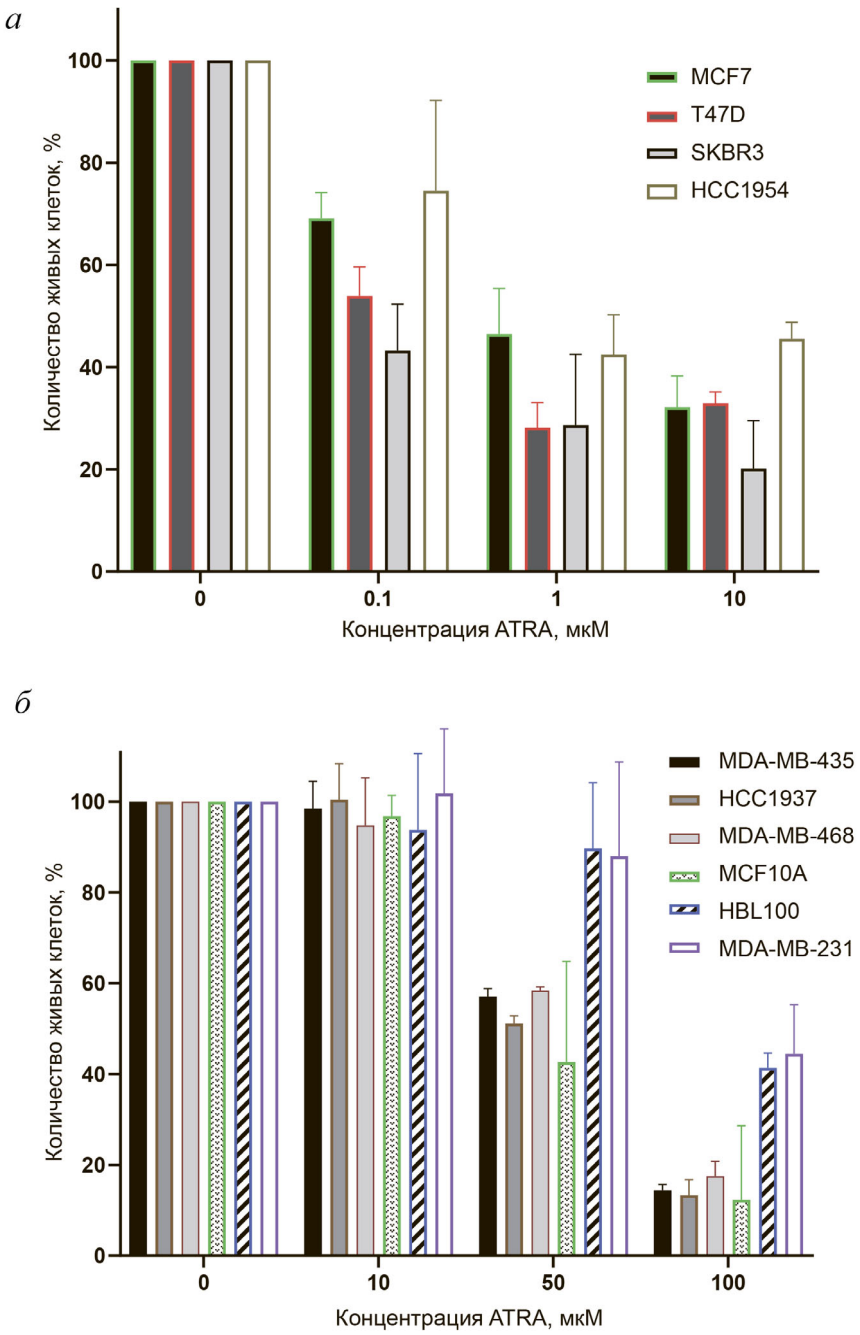
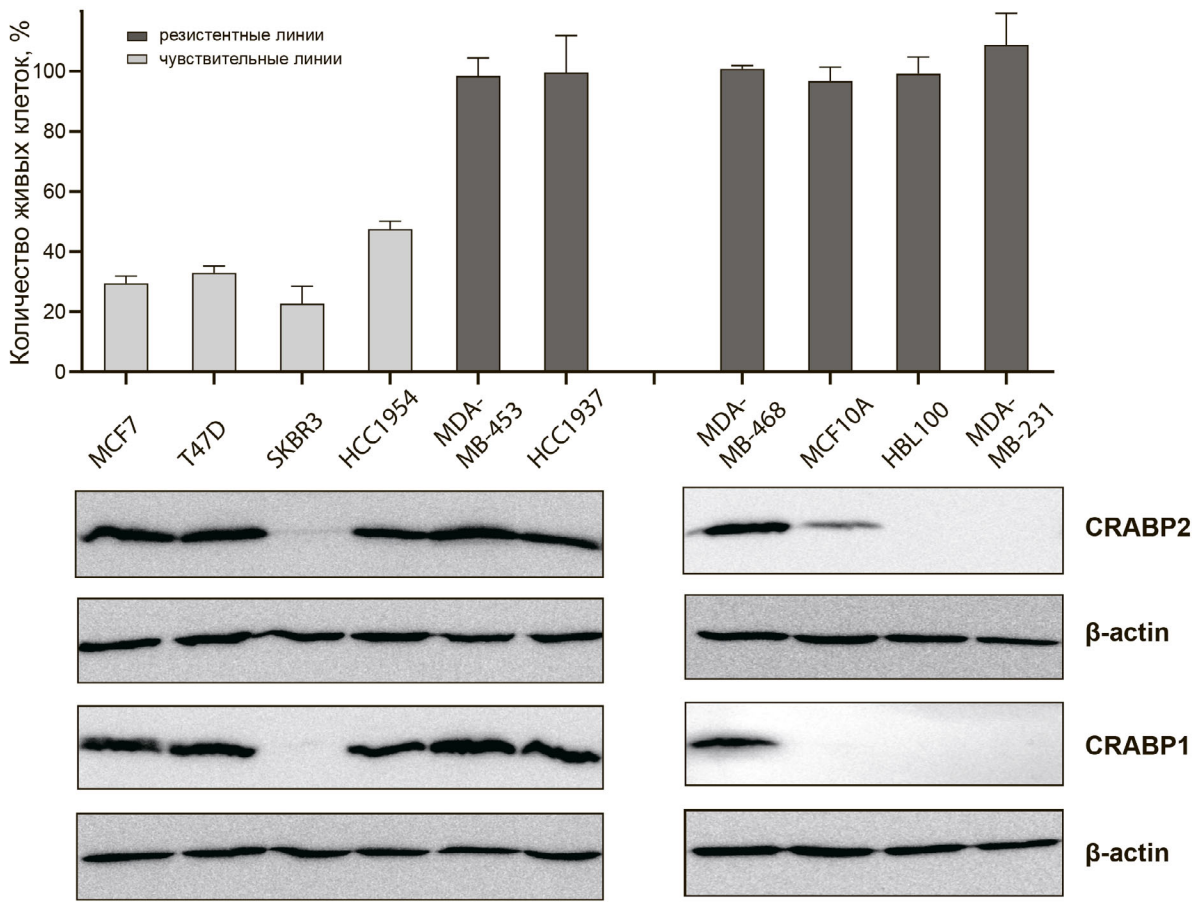


Рис. 2. Сравнение динамики пролиферации клеток РМЖ при инкубации с ATRA. Указан процент живых клеток после 5 сут культивирования в присутствии ATRA в различных концентрациях по сравнению с контролем. Контроль: за 100% взято количество живых клеток каждой линии после культивирования в течение того же времени в стандартной среде DMEM с добавлением ДМСО в концентрациях, соответствующих таковым при разведении ATRA. *а* – РК-чувствительные линии демонстрировали снижение пролиферации (падение ≥ 50% по сравнению с контролем) при концентрации ATRA 0,1–10 мкМ; *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

ствовала, а в РК-резистентных линиях MDA-MB-453, MDA-MB-468 и HCC1937 регистрировался высокий уровень данного белка (рис. 3, *а*).

Тем не менее стоит отметить, что в наиболее устойчивых линиях MDA-MB-231 и HBL100, пролиферация которых значимо не снижалась даже при концентрации ATRA 50 мкМ, продук-

а



б

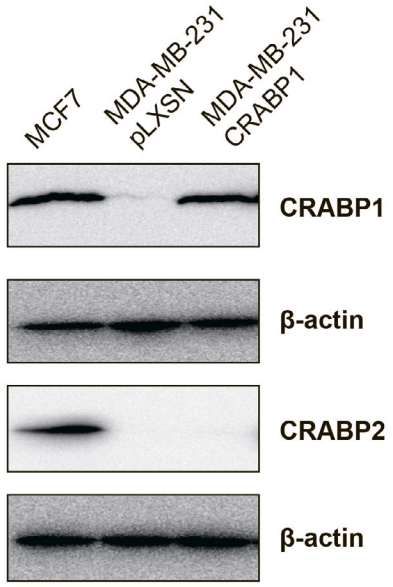


Рис. 3. Сравнение продукции белков CRABP1 и CRABP2 в линиях РМЖ с различной РК-чувствительностью. *а* – Процент живых клеток каждой линии по сравнению с соответствующим контролем (взят за 100%) при инкубации с ATRA в концентрации 10 мкМ и результаты иммуноблоттинга тех же линий; *б* – для подтверждения 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)

ция CRABP1 отсутствовала. Таким образом, для клеток РМЖ РК-чувствительность либо не связана с экспрессией CRABP1, либо определяется совокупностью факторов, в числе которых может быть статус рецепторов ER, PR, HER2/neu и другие характеристики. В то же время полученные данные на линиях клеток РМЖ подтвердили нашу гипотезу о корреляции уровня белков CRABP1 и CRABP2. Так, во всех без исключения линиях с выраженной экспрессией CRABP2 продукция CRABP1 также была представлена на высоком уровне; в линиях, где продукция CRABP2 значительно снижена, CRABP1 почти не детектировался; в линиях с отсутствием CRABP2 также не детектировался и CRABP1. Мы провели дополнительную проверку специфичности работы антител, для чего трансдуцировали кодирующую последовательность *CRABP1* в линию MDA-MB-231, где отсутствовала эндогенная экспрессия данного белка. Как видно на рис. 3, *б*, гиперэкспрессия CRABP1 в производной сублинии MDA-MB-231-CRABP1 хорошо детектируется антителами к данному белку, но не сопровождается увеличением экспрессии CRABP2, что свидетельствует, в частности, об избирательности антител в отношении данных белков.

С учетом результатов анализа белков CRABP в клетках отличного от РМЖ происхождения, полученные результаты свидетельствуют об универсальности обнаруженной нами корреляции между экспрессией белков CRABP1 и CRABP2, что предполагает наличие регуляторной зависимости между данными белками. Важно отметить, что отсутствие CRABP1 наблюдалось при снижении CRABP2, но не наоборот – не было примеров сниженной продукции CRABP1 и отсутствия CRABP2. Также важно, что гиперэкспрессия CRABP1 в обоих случаях (в линиях H460 и MDA-MB-231) не приводила к изменению экспрессии CRABP2. Поэтому мы предположили, что в данной паре белков CRABP2, вероятно, является регулятором CRABP1.

Для проверки этого предположения мы подавили эндогенную экспрессию CRABP2 в 4-х линиях РМЖ с различным уровнем РК-чувствительности: РК-чувствительных линиях MCF7 и T47D и РК-резистентных линиях MDA-MB-453 и MDA-MB-468. Нокдаун проводили методом РНК-интерференции с помощью экспрессии предшественников малых шпилечных РНК (shRNA) к гену *CRABP2*. Две последовательности shRNA (*sh1CRABP2* и *sh2CRABP2*) были клонированы в вектор pLKO.1 puro и трансдуцированы в клетки методом лентивирусной инфекции с последующим отбором производных сублиний на пуромицине. Эффективность обеих шпилечных конструкций оказалась высокой. По данным денситометрического анализа результатов иммуноблоттинга, снижение продукции CRABP2 по сравнению с контрольными линиями, экспрессирующими последовательность shRNA к зеленому флуоресцентному белку (shGFP), в разных линиях варьировала от 1,6 до 10 раз для *sh1CRABP2* и от 2,5 до 10 раз для *sh2CRABP2* (рис. 4). Анализ продукции белка CRABP1 в производных сублиниях показал значительное снижение во всех клетках с нокдауном гена *CRABP2* (рис. 4) по сравнению с соответствующими контролями. Это означает, что уровень CRABP1 регулируется белком CRABP2.

Таким образом, мы впервые выявили наличие строгой корреляции между экспрессией белков CRABP1 и CRABP2 и показали механизм, при котором белок CRABP2 является вышестоящим регулятором (upstream regulator) экспрессии CRABP1. Универсальность обнаруженного феномена свидетельствует о его биологической значимости. CRABP2-зависимая регуляция продукции CRABP1 является дополнительным механизмом реализации внутриклеточной активности ретиноевой кислоты.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Формирование РК-резистентности является одним из основных ограничений применения РК в клинической практике, несмотря на то, что активная разработка ее и других натуральных или синтетических ретиноидов в качестве противоопухолевых препаратов ведется уже в течение долгого времени [28]. Механизмы приобретения устойчивости к РК до сих пор остаются не до конца понятными. Одним из кандидатов на роль «посредника» в формировании РК-резистентности может быть белок CRABP1. Такое предположение основано как на его возможном участии в ограничении биодоступности РК в клетке за счет удержания ее в цитоплазме или даже стимуляции ее катаболизма цитохромом Cyp26A1 [18], так и на данных о метилировании гена *CRABP1* в ряде опухолей [29–33], которые считаются преимущественно РК-резистентными. В то же время по нашим данным, в клетках нейробластомы (классический пример РК-чувствительных опухолей) CRABP1 экспрессируется на высоком уровне, причем его продукция коррелирует с уровнем дифференцировки тканей нейробластомы [34]. Предположительно, CRABP1 может предохранять такие РК-чувствительные клетки от избытка РК. В то же время для ряда опухолей нами [22] и другими авто-

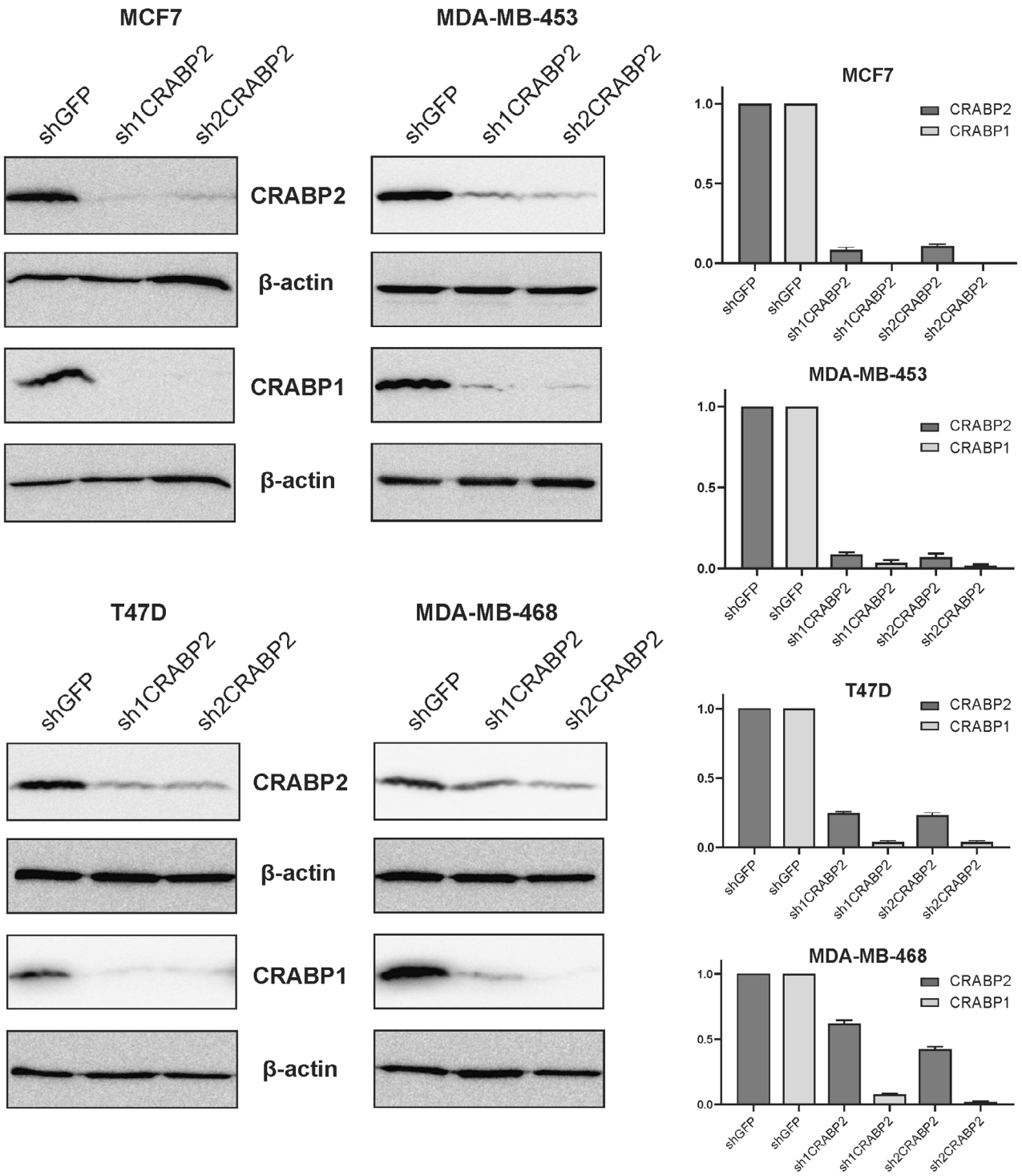


Рис. 4. Влияние нокдауна *CRABP2* на продукцию CRABP1 в линиях РМЖ. Для анализа использованы производные РК-чувствительных (MCF7, T47D) и РК-резистентных (MDA-MB-453, MDA-MB-468) линий РМЖ, экспрессирующих последовательности малых шпилечных РНК к мРНК *CRABP2* (*sh1CRABP2* и *sh2CRABP2)*. В качестве контролей использованы те же линии, экспрессирующие малые шпилечные РНК к зеленому флуоресцентному белку (*shGFP*). Диаграммы построены на основании данных денситометрического подсчета результатов трех независимых повторов эксперимента

рами [11, 12, 35, 36] показана опухоль-промоторная роль CRABP1, которая может быть связана с конкурентным ограничением передачи РК белку CRABP2, основному «проводнику» опухоль-супрессорной активности РК, которая осуществляется за счет ее доставки к ядерным рецепторам RAR/RXR и дальнейшей активации транскрипции проапоптотических, продиффе-

ренцировочных и антипролиферативных генов (рис. 5, *а*). Иными словами, как опухоль-промоторная, так и опухоль-супрессорная (как в случае нейробластомы) роль CRABP1 может быть связана с его функцией ограничения активности РК. Возможно, именно разной чувствительностью конкретных опухолевых клеток к РК объясняются существенные противоречия в литературных данных относительно функционального значения CRABP1 (опухоль-промоторная или опухоль-супрессорная роль) в канцерогенезе. Косвенным подтверждением участия CRABP1 в формировании РК-резистентности могут служить и данные исследования, в котором была показана связь между экспрессией CRABP1 и рецептор-негативным статусом РМЖ [15], который, в свою очередь, часто связан с РК-резистентностью данного типа опухолей [37–39]. Мы предположили, что CRABP1 может способствовать приобретению РК-резистентности изначально РК-чувствительных клеток, ограничивая активность РК в отношении регуляции транскрипции РК-зависимых генов. В РК-резистентных клетках такие ограничения становятся «ненужными», что может приводить к метилированию гена *CRABP1*. В нашей работе мы впервые провели сравнение экспрессии CRABP1 в клеточных линиях опухолей различного происхождения и обнаружили, что в линиях клеток опухолей, считающихся РК-резистентными (три линии НМРЛ, две линии глиобластомы, три линии рака яичников), продукция CRABP1 отсутствует, в то время как в РК-чувствительных клетках (все три линии нейробластомы) данный белок детектируется на достаточно высоком уровне. РМЖ является крайне гетерогенным типом опухолей, как по морфологии, так и по молекулярным характеристикам, включая чувствительность к РК. Для того, чтобы понять, действительно ли существует прямая корреляция между экспрессией CRABP1 и РК-чувствительностью, мы провели анализ влияния РК на динамику пролиферации 9-ти линий РМЖ и обнаружили широкий спектр реакции на ATRA, при этом линии хорошо разделялись на те, у которых значительно (в 2 и более раз) снижалась пролиферация уже при концентрации ATRA 1–10 мкМ (РК-чувствительные), и те, пролиферация которых не менялась при концентрации ATRA 10–20 мкМ (РК-резистентные). Сравнение продукции CRABP1 в этих линиях не выявило корреляции с чувствительностью к РК, хотя следует отметить, что в максимально РК-резистентных линиях, пролиферация которых не менялась при инкубации с ATRA даже в концентрации 50 мкМ, продукция CRABP1 отсутствовала. РК-чувствительные клетки РМЖ были CRABP1-позитивными за исключением линии SKBR3. Такие неоднозначные результаты не позволяют сделать четкий вывод об участии CRABP1 в формировании устойчивости клеток к РК прежде всего потому, что механизмов РК-резистентности может быть много, о чем свидетельствуют и данные литературы [40]. Также важно учитывать упомянутую гетерогенность рака молочной железы, развитие резистентности которого к РК может проходить по разным молекулярным сценариям [41].

Наиболее интересным результатом данного исследования можно считать обнаруженную 100%-ную корреляцию между экспрессией CRABP2 и CRABP1. Следует подчеркнуть, что этот феномен был подтвержден на всех типах опухолевых клеток вне зависимости от их происхождения и РК-чувствительности, что свидетельствует о его биологической значимости. На основании полученных данных мы предположили, что продукция белков CRABP1 и CRABP2 является функционально связанной, причем вышестоящим регулятором является, по-видимому, CRABP2. Ранее исследований этого вопроса не проводилось. Данные единственной работы, в которой анализировались уровни экспрессии и функциональное значение обоих белков CRABP, свидетельствуют скорее о «конкурентных взаимоотношениях» между белками CRABP1 и CRABP2. Авторы статьи предполагают, что CRABP1 ограничивает функцию CRABP2 в отношении реализации ядерной активности РК за счет удержания ее в цитоплазме [15]. Однако речь идет о функциональной конкуренции, а не о регуляции количества белка. В этом контексте представляют интерес наши ранее опубликованные данные о корреляции между экспрессией CRABP1 и CRABP2 в образцах тканей аденокарциномы легкого. Корреляция была обнаружена нами как на уровне мРНК, так и на уровне белковой продукции, причем максимальное значение коэффициента корреляции Спирмена было характерно для высоко- или умеренно дифференцированных опухолей, в то время как в низкодифференцированных опухолях корреляция отсутствовала [21]. Эти данные косвенно указывают на регуляторную связь между белками CRABP1 и CRABP2 и предполагают наличие некоего регуляторного механизма, который, по-видимому, утрачивается в ходе опухолевой прогрессии и дедифференцировки клеток.

Настоящее исследование подтвердило наличие такой регуляции, а также показало, что CRABP2 является регулятором продукции CRABP1. Как может осуществляться CRABP2-

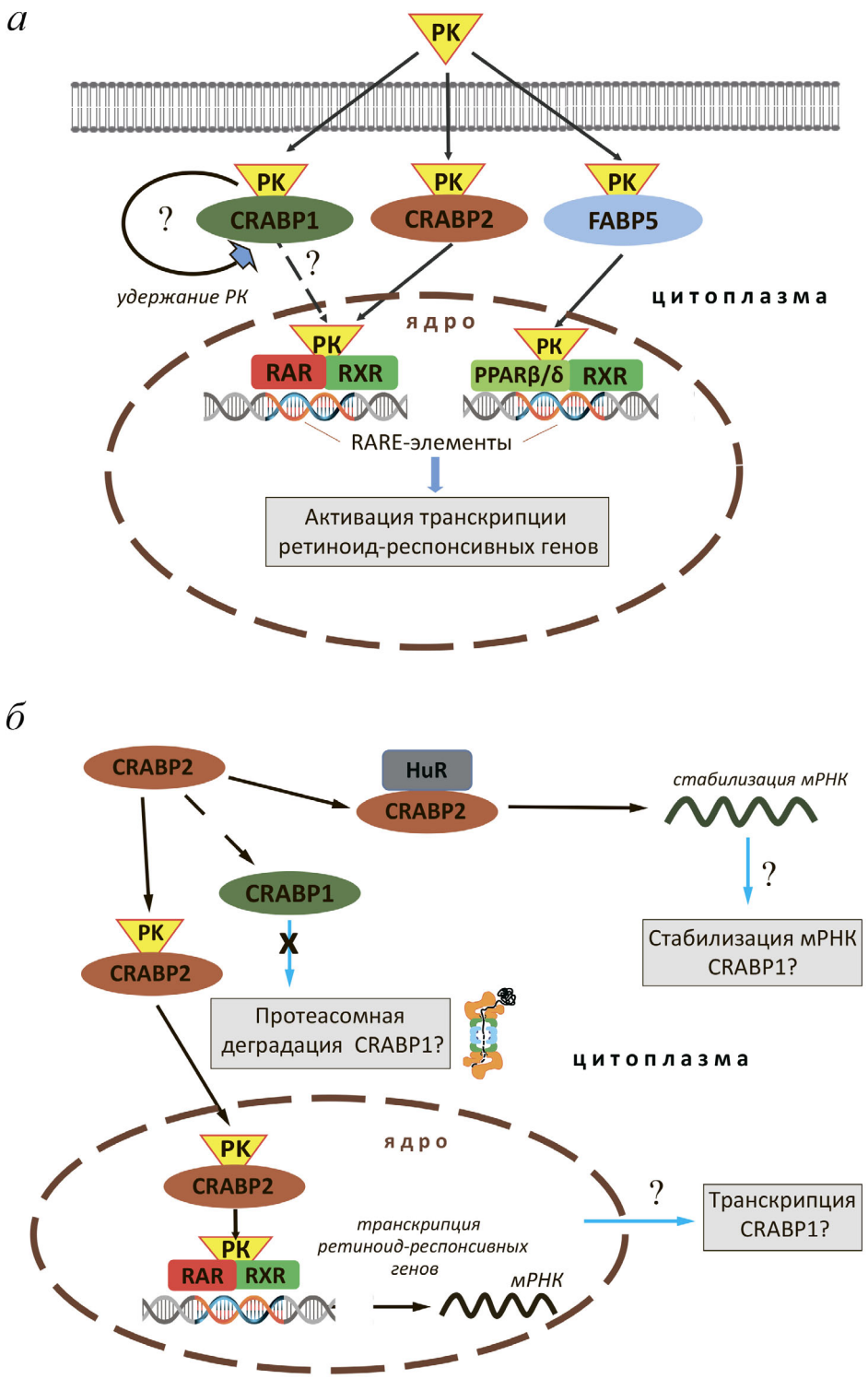


Рис. 5. Возможные механизмы влияния CRABP2 на внутриклеточный уровень белка CRABP1. *а* – Схема реализации функциональной активности РК. Белок CRABP2 обеспечивает транспортировку РК в ядро и передачу ее ядерным рецепторам RAR. Белок FABP5 осуществляет доставку РК к ядерному рецептору PPARβ/δ. Формирование комплекса РК с рецепторами в составе гетеродимеров с RXR стимулирует взаимодействие с RARE в промоторах генов, привлечение коактиваторов и активацию транскрипции. Сходная активность, предположительно, имеется и у белка CRABP1, однако, в отличие от CRABP2, он не образует комплекса с рецепторами РК – предполагается, что передаче РК ядерным рецепторам в этом случае предшествует диссоциация комплекса РК–CRABP1; *б* – гипотетическая схема CRABP2-зависимой регуляции продукции CRABP1. Такая регуляция может реализовываться с помощью CRABP2-зависимой активации транскрипции *CRABP1*, CRABP2-зависимой стабилизации мРНК CRABP1 при участии представителей группы Hu-белков (например, HuR), а также возможной негативной регуляции протеолитической деградации CRABP1

зависимая регуляция белка CRABP1? Можно предположить несколько сценариев (рис. 5, *б*).

Первый вариант предполагает прямую регуляцию экспрессии, когда CRABP2-зависимая доставка РК к ядерным рецепторам приводит к активации транскрипции *CRABP1*, в промоторе которого имеется РК-респонсивный элемент. Помимо трансактивации транскрипции можно предположить наличие механизма CRABP2-зависимой стабилизации транскриптов *CRABP1*. Эта гипотеза основана на показанной в нескольких работах активности CRABP2, не связанной с РК и реализуемой с помощью взаимодействия с представителями группы Hu-белков, относящихся к семейству ELAV (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) [42]. CRABP2, по-видимому, имеет несколько мишеней из этой группы белков, в частности, белки HuD и HuB [9, 10, 43]. Взаимодействие CRABP2 с Hu-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. Можно также предположить, что CRABP2-зависимая регуляция происходит не на уровне транскрипции или посттранскрипционной регуляции мРНК, а реализуется 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 [44–46]. Все вышеперечисленные возможные механизмы будут исследоваться нами в дальнейшем и способствовать пониманию фундаментальных процессов реализации внутриклеточной активности ретиноевой кислоты.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-015-00027А).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Connolly, R. M., Nguyen, N. K., and Sukumar, S. (2013) Molecular pathways: current role and future directions of the retinoic acid pathway in cancer prevention and treatment, *Clin. Cancer Res.*, **19**, 1651-1959, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3175.
2. Schenk, T., Stengel, S., and Zelent, A. (2014) Unlocking the potential of retinoic acid in anticancer therapy, *Br. J. Cancer*, **111**, 2039-2045, doi: 10.1038/bjc.2014.412.
3. Chevkina, E. M., and Favorskaya, I. A. (2015) CRABP proteins – relatives or namesakers? [in Russian], *Uspekhi Mol. Onkol.*, **2**, 6-16, doi: 10.17650/2313-805X.2015.2.2.6-16.
4. Tchevkina, E. M. (2017) Retinoic acid binding proteins and cancer: similarity or polarity? *Cancer Ther. Oncol. Int. J.*, **8**, 555733, doi: 10.19080/ctoij.2017.08.555733.
5. Sussman, F., and De Lera, A. R. (2005) Ligand recognition by RAR and RXR receptors: binding and selectivity, *J. Med. Chem.*, **48**, 6212-6219, doi: 10.1021/jm050285w.
6. Schug, T. T., Berry, D. C., Shaw, N. S., Travis, S. N., and Noy, N. (2007) Opposing effects of retinoic acid on cell growth result from alternate activation of two different nuclear receptors, *Cell*, **129**, 723-733, doi: 10.1016/j.cell.2007.02.050.
7. Schug, T. T., Berry, D. C., Toshkov, I. A., Cheng, L., Nikitin, A. Y., and Noy, N. (2008) Overcoming retinoic acid-resistance of mammary carcinomas by diverting retinoic acid from PPARβ/δ to RAR, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 7546-7551, doi: 10.1073/pnas.0709981105.
8. Liu, R. Z., Graham, K., Glubrecht, D. D., Germain, D. R., Mackey, J. R., and Godbout, R. (2011) Association of FABP5 expression with poor survival in triple-negative breast cancer: implication for retinoic acid therapy, *Am. J. Pathol.*, **178**, 997-1008, doi: 10.1016/j.ajpath.2010.11.075.
9. Vreeland, A. C., Levi, L., Zhang, W., Berry, D. C., and Noy, N. (2014) Cellular retinoic acid-binding protein 2 inhibits tumor growth by two distinct mechanisms, *J. Biol. Chem.*, **289**, 34065-34073, doi: 10.1074/jbc.M114.604041.
10. Vreeland, A. C., Yu, S., Levi, L., de Barros Rossetto, D., and Noy, N. (2014) Transcript stabilization by the RNA-binding protein HuR is regulated by cellular retinoic acid-binding protein 2, *Mol. Cell. Biol.*, **34**, 2135-2146, doi: 10.1128/mcb. 00281-14.
11. Mallikarjuna, K., Sundaram, C. S., Sharma, Y., Deepa, P. R., Khetan, V., et al. (2010) Comparative proteomic analysis of differentially expressed proteins in primary retinoblastoma tumors, *Proteom. Clin. Appl.*, **4**, 449-463, doi: 10.1002/prca.200900069.
12. Liu, R. Z., Li, S., Garcia, E., Glubrecht, D. D., Yin Poon, H., et al. (2016) Association between cytoplasmic CRABP2, altered retinoic acid signaling, and poor prognosis in glioblastoma, *Glia*, **64**, 963-976, doi: 10.1002/glia.22976.
13. Dong, D., Ruuska, S. E., Levinthal, D. J., and Noy, N. (1999) Distinct roles for cellular retinoic acid-binding proteins I and II in regulating signaling by retinoic acid, *J. Biol. Chem.*, **274**, 23695-23698, doi: 10.1074/jbc.274.34.23695.
14. Blaese, M. A., Santo-Hoeltje, L., and Rodemann, H. P. (2003) CRABP I expression and the mediation of the sensitivity of human tumour cells to retinoic acid and irradia-

tion, *Int. J. Radiat. Biol.*, **79**, 981-991, doi: 10.1080/09553000310001632949.
15. Liu, R. Z., Garcia, E., Glubrecht, D. D., Poon, H. Y., Mackey, J. R., and Godbout, R. (2015) CRABP1 is associated with a poor prognosis in breast cancer: adding to the complexity of breast cancer cell response to retinoic acid, *Mol. Cancer*, **14**, 129, doi: 10.1186/s12943-015-0380-7.
16. Fiorella, P. D., and Napoli, J. L. (1991) Expression of cellular retinoic acid binding protein (CRABP) in *Escherichia coli*. Characterization and evidence that holo-CRABP is a substrate in retinoic acid metabolism, *J. Biol. Chem.*, **266**, 16572-16579.
17. Boylan, J. F., and Gudas, L. J. (1992) The level of CRABP-I expression influences the amounts and types of all- trans-retinoic acid metabolites in F9 teratocarcinoma stem cells, *J. Biol. Chem.*, **267**, 21486-21491.
18. Won, J. Y., Nam, E. C., Yoo, S. J., Kwon, H. J., Um, S. J., et al. (2004) 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, *Metab. Clin. Exp.*, **53**, 1007-1012, doi: 10.1016/j.metabol.2003.12.015.
19. Delektorskaya, V. V., Komel'kov, A. V., Zborovskaya, I. B., Enikeev, A. D., Safronova, V. M., and Chevkina, E. M. (2017) Nuclear localization of cellular retinoic acid-binding protein 1 (Crabp1) is associated with malignancy level in lung neuroendocrine tumors [in Russian], *Voprosy Onkologii*, **63**, 886-893.
20. Gaub, M. P., Lutz, Y., Ghyselinck, N. B., Scheuer, I., Pfister, V., et al. (1998) Nuclear detection of cellular retinoic acid binding proteins I and II with new antibodies, *J. Histochem. Cytochem.*, **46**, 1103-1111, doi: 10.1177/002215549804601002.
21. Favorskaya, I., Kainov, Y., Chemeris, G., Komelkov, A., Zborovskaya, I., and Tchevkina, E. (2014) Expression and clinical significance of CRABP1 and CRABP2 in non-small cell lung cancer, *Tumor Biol.*, **35**, 10295-10300, doi: 10.1007/s13277-014-2348-4.
22. Kainov, Y., Favorskaya, I., Delektorskaya, V., Chemeris, G., Komelkov, A., et al. (2014) CRABP1 provides high malignancy of transformed mesenchymal cells and contributes to the pathogenesis of mesenchymal and neuroendocrine tumors, *Cell Cycle*, **13**, 1530-1539, doi: 10.4161/cc.28475.
23. Rossetti, S., and Sacchi, N. (2019) 3D mammary epithelial cell models: a goldmine of dcis biomarkers and morphogenetic mechanisms, *Cancers*, **11**, 130, doi: 10.3390/cancers11020130.
24. Garattini, E., Bolis, M., Garattini, S. K., Fratelli, M., Centritto, F., et al. (2014) Retinoids and breast cancer: from basic studies to the clinic and back again, *Cancer Treat. Rev.*, **40**, 739-749, doi: 10.1016/j.ctrv.2014.01.001.
25. Coyle, K. M., Dean, C. A., Thomas, M. L., Vidovic, D., Giacomantonio, C. A., et al. (2018) DNA methylation predicts the response of triple-negative breast cancers to all-trans retinoic acid, *Cancers*, **10**, 397, doi: 10.3390/cancers10110397.
26. Centritto, F., Paroni, G., Bolis, M., Garattini, S. K., Kurosaki, M., et al. (2015) Cellular and molecular determinants of all-trans retinoic acid sensitivity in breast cancer: luminal phenotype and RARα expression, *EMBO Mol. Med.*, **7**, 950-972, doi: 10.15252/emmm.201404670.
27. Bolis, M., Garattini, E., Paroni, G., Zanetti, A., Kurosaki, M., et al. (2017) Network-guided modeling allows tumor-type independent prediction of sensitivity to all-trans-retinoic acid, *Ann. Oncology*, **28**, 611-621, doi: 10.1093/annonc/mdw660.
28. Coyle, K. M., Sultan, M., Thomas, M. L., Vaghar-Kashani, A., and Marcato, P. (2013) Retinoid signaling in cancer and its promise for therapy, *J. Carcinogen. Mutagen.*, doi: 10.4172/2157-2518.s7-006.
29. Miyake, T., Ueda, Y., Matsuzaki, S., Miyatake, T., Yoshino, K., et al. (2011) CRABP1-reduced expression is associated with poorer prognosis in serous and clear cell ovarian adenocarcinoma, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **137**, 715-722, doi: 10.1007/s00432-010-0930-8.
30. Tanaka, K., Imoto, I., Inoue, J., Kozaki, K., Tsuda, H., et al. (2007) Frequent methylation-associated silencing of a candidate tumor-suppressor, CRABP1, in esophageal squamous-cell carcinoma, *Oncogene*, **26**, 6456-6468, doi: 10.1038/sj.onc.1210459.
31. Lind, G. E., Kleivi, K., Meling, G. I., Teixeira, M. R., Thiis-Evensen, E., et al. (2006) ADAMTS1, CRABP1, and NR3C1 identified as epigenetically deregulated genes in colorectal tumorigenesis, *Cell. Oncol.*, **28**, 259-272, doi: 10.1155/2006/949506.
32. Wu, Q., Lothe, R. A., Ahlquist, T., Silins, I., Tropé, C. G., et al. (2007) DNA methylation profiling of ovarian carcinomas and their *in vitro* models identifies HOXA9, HOXB5, SCGB3A1, and CRABP1 as novel targets, *Mol. Cancer*, **6**, 42, doi: 10.1186/1476-4598-6-45.
33. Wang, F., Yang, Y., Fu, Z., Xu, N., Chen, F., et al. (2014) Differential DNA methylation status between breast carcinomatous and normal tissues, *Biomed. Pharmacother.*, **68**, 699-707, doi: 10.1016/j.biopha.2014.07.014.
34. Stroganova, A. M., Chemeris, G. Yu., Chevkina, E. M., Senderovich, A., Karseladze, A. I. (2016) CRABP protein 1 and its role in the process of differentiation neuroblastoma, *Vestnik RONTs im. N. N. Blokhina*, **27**, 157-163.
35. Bertucci, F., Houlgatte, R., Benziane, A., Granjeaud, S., Adélaïde, J., et al. (2000) Gene expression profiling of primary breast carcinomas using arrays of candidate genes, *Hum. Mol. Genet.*, **9**, 2981-2991, doi: 10.1093/hmg/9.20.2981.
36. Tsibris, J. C. M., Segars, J., Coppola, D., Mane, S., Wilbanks, G. D., et al. (2002) Insights from gene arrays on the development and growth regulation of uterine leiomyomata, *Fertil. Steril.*, **78**, 114-121, doi: 10.1016/S0015-0282(02)03191-6.
37. Fontana, J. A. (1992) Responses to retinoic acid of tamoxifen-sensitive and -resistant sublines of human breast cancer cell line MCF-7, *Cancer Res.*, **52**, 6164-6167.
38. Fontana, J. A. (1987) Interaction of retinoids and tamoxifen on the inhibition of human mammary carcinoma cell proliferation, *Pathobiology*, **55**, 136-144, doi: 10.1159/000163409.
39. Van der Leede, B. J. M., Folkers, G. E., van den Brink, C. E., van der Saag, P. T., and van der Burg, B. (1995) Retinoic acid receptor α1 isoform is induced by estradiol and confers retinoic acid sensitivity in human breast cancer cells, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **109**, 77-86, doi: 10.1016/0303-7207(95)03487-R.
40. Chlapek, P., Slavikova, V., Mazanek, P., Sterba, J., and Veselska, R. (2018) Why differentiation therapy sometimes fails: Molecular mechanisms of resistance to retinoids, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 132, doi: 10.3390/ijms19010132.
41. Tari, A. M., Lim, S. J., Hung, M. C., Esteva, F. J., and Lopez-Berestein, G. (2002) Her2/neu induces all-trans retinoic acid (ATRA) resistance in breast cancer cells, *Oncogene*, **21**, 5224-5232, doi: 10.1038/sj.onc.1205660.
42. Wang, J., Guo, Y., Chu, H., Guan, Y., Bi, J., and Wang, B. (2013) Multiple functions of the RNA-binding protein HuR in cancer progression, treatment responses and prognosis, *Int. J. Mol. Sci.*, **14**, 10015-10041, doi: 10.3390/ijms140510015.
43. Gupta, A., Williams, B. R. G., Hanash, S. M., and Rawwas, J. (2006) Cellular retinoic acid-binding protein II is a direct transcriptional target of MycN in neuroblas-

toma, *Cancer Res.*, **66**, 8100-8108, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4519.
44. Babuke, T., Ruonala, M., Meister, M., Amaddii, M., Genzler, C., Esposito, A., and Tikkanen, R. (2009) Hetero-oligomerization of reggie-1/flotillin-2 and reggie-2/flotillin-1 is required for their endocytosis, *Cell. Signal.*, **21**, 1287-1297, doi: 10.1016/j.cellsig.2009.03.012.
45. Frick, M., Bright, N. A., Riento, K., Bray, A., Merrified, C., and Nichols, B. J. (2007) Coassembly of flotillins induces formation of membrane microdomains, membrane curvature, and vesicle budding, *Curr. Biol.*, **17**, 1151-1156, doi: 10.1016/j.cub.2007.05.078.
46. Solis, G. P., Hoegg, M., Munderloh, C., Schrock, Y., Malaga-Trillo, E., Rivera-Milla, E., and Stuermer, C. A. O. (2007) Reggie/flotillin proteins are organized into stable tetramers in membrane microdomains, *Biochem. J.*, **403**, 313-322, doi: 10.1042/BJ20061686.

CRABP1 AND CRABP2 PROTEIN LEVELS DO NOT CORRELATE WITH THE SENSITIVITY OF BREAST CANCER CELLS TO RETINOIC ACID, BUT CORRELATE WITH EACH OTHER WITH CRABP2 BEING AN UPSTREAM REGULATOR OF CRABP1 PRODUCTION*

A. D. Enikeev, A. V. Komelkov, M. E. Axelrod, S. A. Galetsky, S. A. Kuzmichev, and E. M. Tchevkina**

Blokhin National Medical Research Center of Oncology, 115478 Moscow, Russia; E-mail: komelkov@gmail.com

Retinoic acid (RA) binding proteins, CRABP1 and CRABP2, are molecular chaperones that mediate intracellular activity of RA, the key promoter of cell differentiation with tumor suppressor activity. One of the main functions of CRABP2 is delivery and transfer of RA to the nuclear receptors RAR/RXR, which leads to activation of the transcription of a wide range of retinoid-responsive genes. The functions of CRABP1 are less studied but are apparently associated with sequestration of RA in cytoplasm and limitation of its transcriptional activity, suggesting involvement of this protein in the development of RA resistance. The mechanisms regulating activity of CRABP1 are also poorly understood. Comparison of the CRABP1 level in tumor cell lines of various origins, performed for the first time here, showed absence of the CRABP1 protein in the cell lines of tumors considered to be RA-resistant, and pronounced production of this protein in the RA-sensitive cells. However, analysis carried out with a panel of breast cancer cell lines with different levels of RA-sensitivity showed that there was no correlation between the production of CRABP1 protein and the sensitivity of the cells to RA. At the same time, we found strong correlation between the expression of CRABP1 and CRABP2 proteins in all studied cell types, regardless of their origin and RA-sensitivity/resistance. Moreover, suppression of the CRABP1 level in both RA-sensitive and RA-resistant cells was shown in the cells with cells with knockdown of *CRABP2* gene. The revealed CRABP2-dependent regulation of CRABP1 production is a new mechanism of the intracellular retinoic signaling system.

Keywords: retinoic acid, retinoic acid binding proteins, ATRA, CRABP1, CRABP2, proliferation, expression regulation