

ПРОТИВОПОЛОЖНОЕ ВЛИЯНИЕ ГОМОЛОГОВ CRABP1 И CRABP2 НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ИХ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К РЕТИНОВОЙ КИСЛОТЕ

© 2023 А.Д. Еникеев¹, П.М. Абрамов¹, Д.С. Елкин¹, А.В. Комельков¹,
А.А. Беляева¹, Д.М. Силантьева², Е.М. Чевкина^{1*}

¹ ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России,
115522 Москва, Россия; электронная почта: tchevkina@mail.ru

² ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, 117997 Москва, Россия

Поступила в редакцию 27.07.2023

После доработки 23.10.2023

Принята к публикации 30.10.2023

Резистентность опухолевых клеток к ретиноевой кислоте (РК), перспективному терапевтическому агенту, является основным ограничением для ее использования в клинической практике. Механизмы формирования РК-резистентности до сих пор мало понятны. Белки, связывающие ретиноевую кислоту, CRABP1 и CRABP2, являются важнейшими проводниками ретиноевого сигнала, однако роль обоих гомологов в регуляции чувствительности клеток к РК ранее практически не исследовалась. Также ранее не проводилось сравнение влияния CRABP1 и CRABP2 на пролиферацию клеток. В данной работе с использованием широкой панели клеточных линий рака молочной железы (РМЖ) впервые показано, что в РК-чувствительных клетках экспрессия CRABP1 ограничивается метилированием гена, при этом количество белка сильно варьирует. В средне-резистентных к РК линиях наблюдается высокий уровень CRABP1 как на уровне мРНК, так и белка, не меняющийся при подавлении метилирования ДНК. Максимально-резистентные к РК линии характеризуются полной репрессией *CRABP1*, реализуемой на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях, а экзогенная экспрессия каждого из гомологов CRABP не оказывает влияние на исследуемые характеристики. Белки CRABP1 и CRABP2 оказывают противоположное влияние на пролиферацию и РК-чувствительность, причем в РК-чувствительных клетках CRABP1 стимулирует пролиферацию и РК-резистентность, а CRABP2 – снижает пролиферацию и сенситизирует клетки к РК, в то время как в более резистентных клетках роль каждого из гомологов меняется на обратную. В целом, мы впервые показали, что белки CRABP оказывают различное воздействие на рост и чувствительность к РК клеток РМЖ (стимуляция, подавление или отсутствие воздействия) в зависимости от исходного уровня РК-чувствительности, при этом воздействие гомологов CRABP1 и CRABP2 на исследуемые характеристики всегда противоположно.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ретиноевая кислота, ATRA, CRABP1, CRABP2, пролиферация, РК-резистентность, рак молочной железы.

DOI: 10.31857/S0320972523120126, **EDN:** NNOYBA

ВВЕДЕНИЕ

Ретиноевая кислота является одним из наиболее активных внутриклеточных метаболитов ретинола (ретиноидов) и играет важнейшую роль в дифференцировке клеток и тканей. В связи с обнаруженной дифференцировочной, а в ряде случаев антипролиферативной активностью предпринимаются активные попытки использования РК, прежде всего, ее

наиболее активного метаболита, полностью *транс*-ретиноевой кислоты (all-*trans* retinoic acid, ATRA), а также других природных и синтетических ретиноидов в терапии злокачественных опухолей. Наиболее успешно ATRA применяется в лечении острого промиелоцитарного лейкоза [1]. Имеются и другие примеры использования ретиноидов для лечения солидных опухолей [2]. Например, предпринимались успешные попытки использования ATRA

Принятые сокращения: РК – ретиноевая кислота; РМЖ – рак молочной железы; ATRA – полностью *транс*-ретиноевая кислота; CRABP1 и CRABP2 – клеточные белки, связывающие ретиноевую кислоту 1 и 2; DAC – 5-Аза-2'-дезокситидин; RAR – рецептор ретиноевой кислоты; TSA – трихостатин А.

* Адресат для корреспонденции.

для лечения опухолей головы и шеи [3], а также 13-*цис*-РК и фенретинида (4-НРР) для лечения пациентов с нейробластомой [4]. Одним из основных ограничений терапии на основе ретиноидов является быстрое приобретение опухолевыми клетками резистентности [5, 6], механизмы формирования которой остаются не до конца понятными. РК регулирует экспрессию нескольких сотен генов с помощью активации ядерных рецепторов, прежде всего, транскрипционных факторов RAR (Retinoic acid receptors) [7]. Транспорт РК в ядро и защита в гидрофильной среде цитоплазмы осуществляется липид-связывающими белками семейства *ilBP* – CRABP1, CRABP2, FABP5 [8]. Белки, связывающие РК, CRABP1 и CRABP2 (Cellular retinoic acid binding proteins 1, 2), являются эволюционно высококонсервативными и близкородственными белками. Их гомология по аминокислотным остаткам составляет 74%, также большим сходством отличается и третичная структура этих белков. Важно, что наиболее высоким сродством к РК характеризуется CRABP1 [9]. Основной четко доказанной функцией белка CRABP2 является связывание РК в цитоплазме, защита ее от деградации и транспортировка в ядро. В ядре происходит непосредственное взаимодействие РК-связанного CRABP2 с RAR-белками, и это взаимодействие приводит к усилению экспрессии RAR-зависимых генов [10]. Функция CRABP1 в отношении проведения ретиноевого сигналинга на сегодняшний день менее понятна. Ряд данных указывает на сходство функций CRABP1 с CRABP2 [11, 12], однако имеются и данные о том, что скорость катаболизма РК увеличивается в присутствии CRABP1 [13], а формирование комплекса РК–CRABP1 способствует взаимодействию РК с CYP26A1 (основным ферментом ее катаболизма) [14]. Более того, экспрессия CRABP1 приводит к подавлению транскрипции некоторых ретиноид-респонсивных генов [15]. В соответствии с этими данными, одной из основных функций CRABP1 может быть негативная регуляция активности РК и защита клетки от ее избытка, которая осуществляется за счет удержания РК в цитоплазме (секвестрирования) или даже за счет усиления ее метаболизма [13–15].

Участие белков CRABP в канцерогенезе показано многократно, однако данные о роли каждого из гомологов в опухолевой прогрессии очень противоречивы. Принято считать, что CRABP2 в большинстве клеток выполняет роль опухолевого супрессора, преимущественно за счет активации CRABP2/RAR сигнального пути и стимуляции транскрипции дифференциро-

вочных и проапоптотических генов [16, 17]. Однако в некоторых типах опухолей CRABP2 способствует опухолевой прогрессии, а его уровень коррелирует с агрессивностью опухолей и негативным прогнозом заболевания [18–21]. Еще более противоречива роль CRABP1 в канцерогенезе. Экспрессия CRABP1 повышена при раке поджелудочной железы [22], немелкоклеточном раке легкого [23], а ее снижение характерно для папиллярной карциномы щитовидной железы [24] и плоскоклеточного рака пищевода [25]. Имеется ряд данных о метилировании гена *CRABP1* во многих опухолях, причем уровень метилирования коррелировал со степенью злокачественности [24–26].

Значение белков CRABP в развитии резистентности к РК исследовалось крайне мало. Показано, что CRABP1 усиливает РК-резистентность клеток рака шейки матки [27], а CRABP2 снижает РК-резистентность клеток рака молочной железы (РМЖ) [28]. При этом лишь в единственной работе, выполненной на линии клеток РМЖ MCF7, сравнивалось значение обоих гомологов, которое показало, что CRABP1 способствует резистентности, а CRABP2 – чувствительности клеток к действию АТРА [16].

Данное исследование является продолжением ранее опубликованной работы [29] и посвящено изучению роли белков CRABP в РК-резистентности и прогрессии РМЖ. С использованием широкой панели клеточных линий с различным уровнем РК-чувствительности впервые проведено исследование особенностей экспрессии генов *CRABP1* и *CRABP2*, а также влияния белков CRABP на рост и РК-резистентность. В работе обнаружено, что в максимально-резистентных клетках трижды-негативного РМЖ эндогенная экспрессия обоих белков отсутствует и не восстанавливается при ингибировании метилирования ДНК и деацетилирования гистонов, а экзогенная экспрессия каждого из гомологов не влияет на исследуемые характеристики. В высокочувствительных клетках экзогенная экспрессия *CRABP1* стимулирует, а *CRABP2* подавляет рост и РК-резистентность. В клетках более резистентных линий CRABP1 и CRABP2 также оказывают противоположный эффект в отношении исследуемых характеристик, однако роль каждого из гомологов меняется на обратную – CRABP1 подавляет, а CRABP2 усиливает рост и РК-резистентность. Полученные данные свидетельствуют о противоположном функциональном значении белков CRABP1 и CRABP2 в проведении ретиноевого сигналинга и прогрессии РМЖ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные линии. В работе были использованы клеточные линии РМЖ из коллекции ATCC: ER-позитивные — MCF7 (HTB-22), T47D (HTB-133); HER2-позитивные — SKBR3 (HTB-30), HCC1954 (CRL-2338), MDA-MB-453 (HTB-131); с трижды-негативным рецепторным статусом (с отсутствием экспрессии ER, PR и HER2) — HCC1937 (CRL-2336), MDA-MB-468 (HTB-132), MDA-MB-231 (HTB-26), HBL100 (HTB-124). Для направленной модификации экспрессии использованы клетка-паковщики 293FT («Invitrogen», США) и GP293 («Clontech», США). Линии MCF7, MDA-MB-453, MDA-MB-468, MDA-MB-231, HBL100 культивировали в среде DMEM («ПанЭко», Россия), содержащей 0,294 мг/мл L-глутамина, 10% эмбриональной телячьей сыворотки («HyClone», США), 0,1 мг/мл стрептомицина, 100 ед./мл пенициллина, при 37 °C в атмосфере 5% CO₂. Линии T47D, SKBR3, HCC1954, HCC1937 культивировали в среде RPMI («ПанЭко») с теми же добавками и в тех же условиях.

Анализ чувствительности клеток к ретиноевой кислоте. ATRA («Sigma-Aldrich», США) растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) («ПанЭко») до концентрации 10 мМ. Клетки высаживали в количестве $(5-30) \times 10^4$ на 35-мм чашки (до достижения клетками 80% конfluence в конце инкубации), культивировали в течение 120 ч в присутствии 0,1–100 мкМ ATRA, снимали раствором Версена-Трипсина-ЭДТА («ПанЭко»), смешивали с красителем трипановый синий и подсчитывали в камере Горяева. В качестве контроля использовали клетки, культивируемые параллельно в течение того же времени в среде, содержащей ДМСО в концентрации, соответствующей наибольшей концентрации ATRA. Количество живых клеток в контроле для каждой линии брали за 100%.

Оценка влияния ингибиторов ДНК-метилтрансферазы и гистондеацетилазы (HDAC) на экспрессию CRABP1. Деметилирование ДНК проводили с помощью децитабина (DAC, 5-Аза-2'-дезоксцитидин) («Sigma-Aldrich») — специфического ингибитора ДНК-метилтрансферазы; для оценки значения деацетилирования гистонов использовали трихостатин А (TSA) («Sigma-Aldrich») — ингибитор гистондеацетилазы. Клетки всех исследованных линий РМЖ высаживали в количестве $(15-80) \times 10^4$ на 60-мм чашки, на следующий день добавляли 0,5–10 мкМ DAC и инкубировали 72 ч. Клетки MDA-MB-231 и HBL100 обрабатывали TSA (100 нМ TSA в течение 24 ч); со-

четанное воздействие обоих соединений оценивали с помощью инкубации с DAC (5 мкМ, 48 ч), а затем с TSA (100 нМ, 24 ч). Контрольные клетки инкубировали с ДМСО в концентрации, соответствующей максимальной концентрации DAC или TSA.

Обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция в реальном времени (ОТ ПЦР-РВ). Для получения кДНК использовали 2000 нг тотальной РНК; проводили реакцию обратной транскрипции с использованием MMLV-ревертазы, случайного дека-нуклеотидного праймера (20 мкМ) («Евроген», Россия). Реакцию проводили при 37 °C в течение 50 мин. Концентрацию кДНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop® ND-1000 («NanoDrop Technologies Inc.», США), в реакцию ПЦР брали 100 нг кДНК на лунку. К 100 нг кДНК добавляли по 500 нМ смеси праймеров (табл. П1 в Приложении) и реакционную смесь для ПЦР-РВ в присутствии SYBR-green («Евроген», Россия). Амплификацию проводили в режиме: 95 °C — 15 с, 57 °C — 15 с, 72 °C — 30 с, 42 цикла. Относительный уровень экспрессии мРНК вычисляли методом $\Delta\Delta C_t$. Нормализацию проводили по количеству ПЦР-продукта гена *RPL27*.

Модификация экспрессии CRABP1 и CRABP2. Получение клеточных линий с экзогенной экспрессией CRABP1 и CRABP2. Молекулярное клонирование и псевдоретровирусную инфекцию проводили по описанной ранее методике [30]. Кодировочные последовательности *CRABP1* и *CRABP2* были клонированы в ретровирусный вектор pLXSN-neo («Clontech», США) по сайтам рестрикции XhoI («СибЭнзим», Россия) и BamHI («СибЭнзим») (cds *CRABP1* — NM_004378.3, cds *CRABP2* — NM_001878.4). Проверку осуществляли с помощью секвенирования, рестрикции полученных конструкторов, а также методом ПЦР с помощью следующих праймеров: pLXSN F: 5'-CCCTTGAACCTCCTCGTTTCG-3' и pLXSN R: 5'-TTTCCACACCTGGTTGCTGA-3'. Клетка-паковщики GP293 трансфицировали плазмидами pLXSN и pVSV-G («Addgene», США) с добавлением реагента Polyfect («Qiagen», Германия); в течение последующих 96 ч (каждые 24 ч) собирали инокуляты вируса. Производные стабильные сублинии получали методом псевдоретровирусной инфекции с последующим отбором клеток на генитине (500 мкг/мл — для SKBR3, 700 мкг/мл — для HBL100, 1000 мкг/мл — для MCF7 и MDA-MB-231). Для контрольных экспериментов получали стабильные производные тех же линий, в которые трансдуцировали не содержащий вставки вектор pLXSN-neo.

Получение клеточных линий с нокдауном CRABP1 и CRABP2. Предшественники малых шпилечных РНК (shRNA) к кодирующим последовательностям *CRABP1* и *CRABP2* были клонированы в лентивирусный вектор pLKO.1-puro («Addgene») по сайтам рестрикции AgeI (рестриктазой AsiGI («СибЭнзим»)) и EcoRI («СибЭнзим») по описанной ранее методике [29]. Последовательности представлены в табл. П2 в Приложении. Результаты проверяли с помощью секвенирования с использованием праймера pLKO.1-seq standart F: 5'-GACATCATATGCTTACCGT-3'. Клетки-паковщики 293FT трансфицировали плазмидами pLKO.1-puro, pVSV-G и pΔR8.2 («Addgene») с добавлением реагента Polyfect; в течение последующих 96 ч (каждые 24 ч) собирали инокуляты вируса. Производные стабильные сублинии получали методом псевдолентивирусной инфекции с последующим отбором клеток на пуromицине (1 мкг/мл — для MCF7, MDA-MB-468 и HCC1937). Для контрольных экспериментов получали стабильные производные тех же линий, экспрессирующие shRNA к зеленому флуоресцентному белку (shGFP).

Иммуноблоттинг. Клетки в количестве $(8-15) \times 10^5$ в зависимости от клеточной линии лизировали RIPA-лизирующим буфером, для иммуноблоттинга брали по 15 мкг белка на лунку. Иммуноблоттинг проводили по описанной ранее методике [30]. Использовали первичные кроличьи антитела к CRABP1 («Sigma-Aldrich», HPA17203; 1 : 1000) или CRABP2 («Sigma-Aldrich», HPA004135; 1 : 500). В качестве контроля нанесения белка использовали первичные кроличьи антитела к β-актину («Abcam», Великобритания, ab8227; 1 : 5000). В качестве вторичных анител использовали козы антикроличьи антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена («Cell Signaling Technology», США, 29902; 1 : 65 000).

Статистический анализ. Для сравнения пролиферации двух групп клеток (количества живых клеток после 120 ч культивирования) использовали *t*-критерий Стьюдента. Для анализа РК-резистентности клеток после 5 дней инкубации с ATRA использовали двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA. Для сравнения относительного уровня экспрессии мРНК 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. Статистически значимыми во всех случаях считали значения $p < 0,05$. Все данные были получены в результате трех независимых экспериментов и представлены в виде среднего $\pm$ стандартное отклонение (SD). Для расчетов и построения графиков была использована программа GraphPad Prism 8.3 (GraphPad Software, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспрессия CRABP1 и CRABP2 в РК-чувствительных клетках варьирует в широком диапазоне и отсутствует в максимально-резистентных клетках. Ранее мы показали, что уровень РК-чувствительности/резистентности клеток РМЖ варьирует в широком диапазоне [29]. По нашим данным, ATRA оказывает преимущественно не цитотоксическое, а антипролиферативное действие. В клетках наблюдается задержка клеточного цикла в Go/G1 и незначительное увеличение клеток в позднем апоптозе-некрозе. На основании сравнительного анализа линии клеток, пролиферация которых снижалась при инкубации с ATRA в концентрации до 10 мкМ, были отнесены к РК-чувствительным. Среди них были выделены линии, чувствительные к дозам РК, приближенным к физиологическим значениям (до 1 мкМ — «максимально-чувствительные») и линии, чувствительные к средним концентрациям ATRA (до 10 мкМ — «средне-чувствительные»). К первой группе относились клетки, пролиферация которых снижалась более чем в 2 раза по сравнению с контролем (т.е. количество живых клеток после инкубации с ATRA снижалось до 50% и более при 0,1–1 мкМ ATRA). Ко второй группе относились клетки, пролиферация которых снижалась до тех же значений в диапазоне 1–10 мкМ ATRA. Линии клеток, пролиферация которых не снижалась при обработке 10 мкМ ATRA, были отнесены к РК-резистентным. РК-резистентные линии, в свою очередь, разделились на «средне-резистентные» и «максимально-резистентные», пролиферация которых снижалась в 2 раза при 50 мкМ и более 100 мкМ ATRA соответственно (табл. 1).

Мы показали, что данные линии также сильно различаются по уровню экспрессии белка CRABP1 (от полного отсутствия до высокого уровня продукции), при этом строгой корреляции экспрессии CRABP1 с РК-чувствительностью обнаружено не было, однако в большинстве РК-чувствительных клеток CRABP1 детектировался (за исключением SKBR3),

Таблица 1. Уровень РК-чувствительности линий клеток РМЖ*

РК-чувствительные, ER(+) или HER2(+)		РК-резистентные, трижды негативный статус	
максимально-чувствительные	средне-чувствительные	средне-резистентные	максимально-резистентные
SKBR3 (IC ₅₀ = 0,05 мкМ)	MCF7 (IC ₅₀ = 0,63 мкМ)	HCC1937 (IC ₅₀ = 50 мкМ)	MDA-MB-231 (IC ₅₀ = 94 мкМ)
T47D (IC ₅₀ = 0,13 мкМ)	HCC1954 (IC ₅₀ = 2,90 мкМ)	MDA-MB-468 (IC ₅₀ = 57 мкМ)	HBL100 (IC ₅₀ = 93 мкМ)

Примечание. * На основании ранее опубликованных данных [29]. IC₅₀ (концентрация полумаксимального ингибирования) — концентрация ATRA, необходимая для 50%-ного ингибирования роста клеток по сравнению с контролем.

в то время как в максимально-резистентных линиях белок отсутствовал [29]. Мы предположили, что если экспрессия CRABP1 и РК-резистентность клеток РМЖ связаны, то данная взаимосвязь может быть сложнее, чем казалось на первый взгляд. Для более детального изучения возможной связи экспрессии CRABP1 с РК-резистентностью в данной работе мы сравнили уровень мРНК *CRABP1* в клетках той же панели линий РМЖ: SKBR3, T47D, MCF7, HCC1954, HCC1937, MDA-MB-468, MDA-MB-231 и HBL100 (по 2 линии из каждой группы РК-чувствительности). Результаты анализа ожидаемо подтвердили, что в максимально-резистентных клетках MDA-MB-231 и HBL100 (с отсутствием белка CRABP1), мРНК *CRABP1* практически не детектируется, а в средне-резистентных клетках HCC1937 и MDA-MB-468 с высокой продукцией белка CRABP1 мРНК *CRABP1* продуцировалась на максимальном уровне (рис. 1, а). В РК-чувствительных линиях экспрессия *CRABP1* была существенно ниже, причем, к нашему удивлению, в клетках MCF7 и HCC1954 при достаточно высоком уровне белка CRABP1 (рис. 1, б) мРНК детектировалась на крайне низком уровне (значения Ct = 36 и более циклов). Интересно, что для CRABP2 такого эффекта не наблюдается, т.е. уровень мРНК соотносится с уровнем белка. Мы также подтвердили корреляцию между уровнями белков CRABP1 и CRABP2 в исследуемых линиях РМЖ.

Коэффициент корреляции Спирмена, по данным обсчета трех независимых повторов эксперимента, составил $r = 0,8921$, p (two-tailed) $< 0,0001$.

Подавление метилирования ДНК приводит к повышению экспрессии CRABP1 в РК-чувствительных клетках, в то время как в РК-резистентных клетках продукция CRABP1 не восстанавливается при ингибировании метилирования ДНК и деацетилировании гистонов. Для того чтобы понять, связаны ли обнаружен-

ные различия в экспрессии мРНК *CRABP1* с ингибированием транскрипции, вызванным метилированием гена, клетки обрабатывали деметилирующим агентом DAC. Во всех РК-чувствительных клетках (SKBR3, T47D, MCF7 и HCC1954) обработка приводила к увеличению экспрессии, причем количество мРНК *CRABP1* возрастало при повышении концентрации DAC (рис. 2, а). В тех же линиях происходило и увеличение белка CRABP1, в том числе в линии SKBR3, где в стандартных условиях продукция этого белка не детектировалась. В то же время во всех РК-резистентных клетках (HCC1937, MDA-MB-468, MDA-MB-231 и HBL100) обработка DAC не влияла на экспрессию CRABP1. На рис. 2, б представлены примеры максимально выраженного эффекта (клетки SKBR3) и отсутствия изменений (клетки HCC1937).

Такие результаты указывают на то, что в полностью РК-резистентных клетках отсутствие экспрессии CRABP1 как на уровне мРНК, так и на уровне белка связано с более глубоким уровнем репрессии и обусловлено, по-видимому, иными механизмами эпигенетической регуляции.

В качестве одного из возможных механизмов, обуславливающих эпигенетическое молчание *CRABP1* в максимально-резистентных клетках, мы исследовали деацетилирование гистонов, которое способствует конденсации нуклеосом и приводит к репрессии генов. Мы обнаружили, что обработка TSA приводит к крайне незначительной индукции экспрессии *CRABP1* в обеих линиях (MDA-MB-231 и HBL100), (продукт начинает регистрироваться на 38–39-м цикле). Более того, сочетание воздействия DAC и TSA не приводит к дополнительному повышению экспрессии *CRABP1* в MDA-MB-231. В то же время в клетках HBL100 данное сочетание привело к увеличению мРНК *CRABP1* более чем в 100 раз. Однако, как и в случае с DAC, инкубация клеток

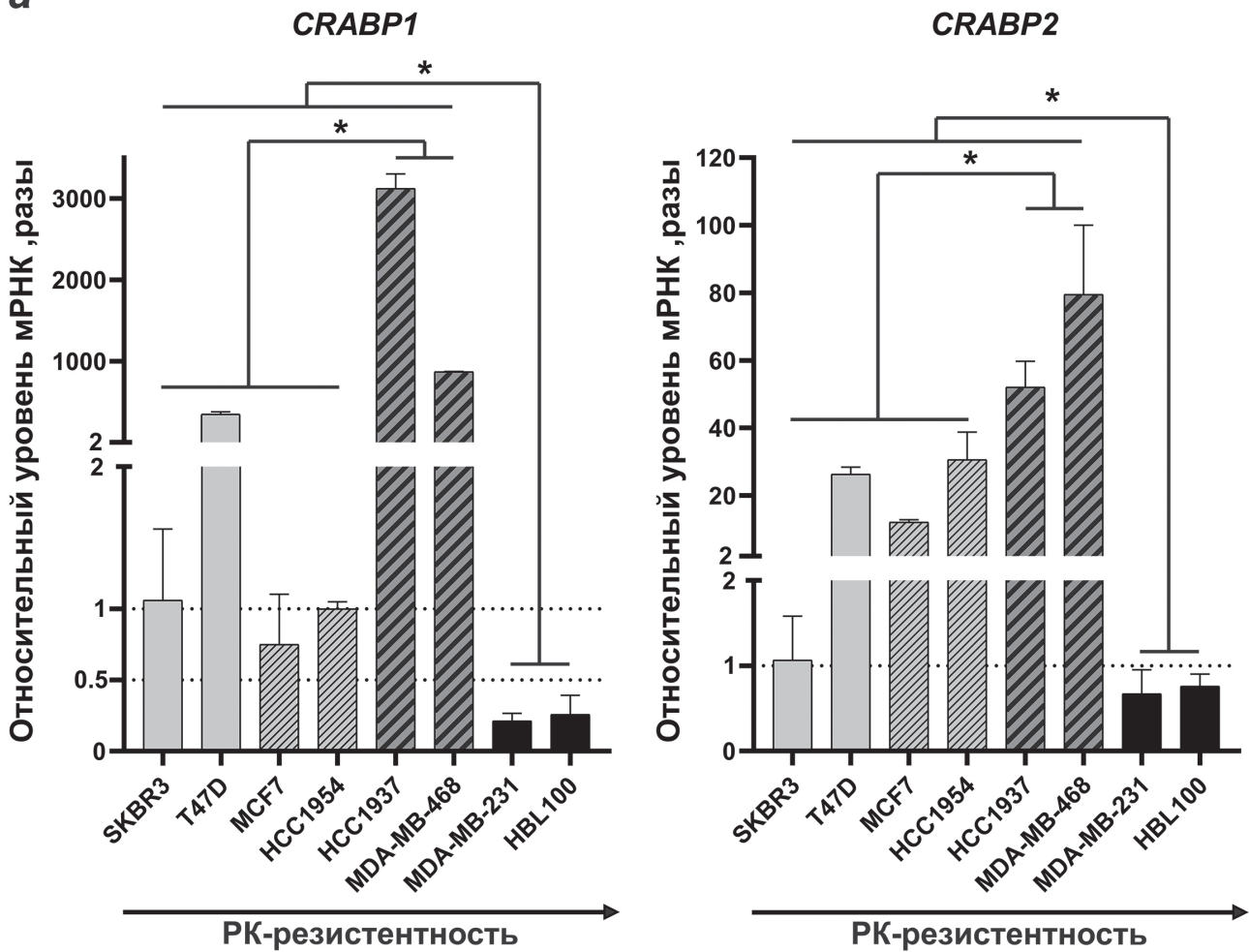
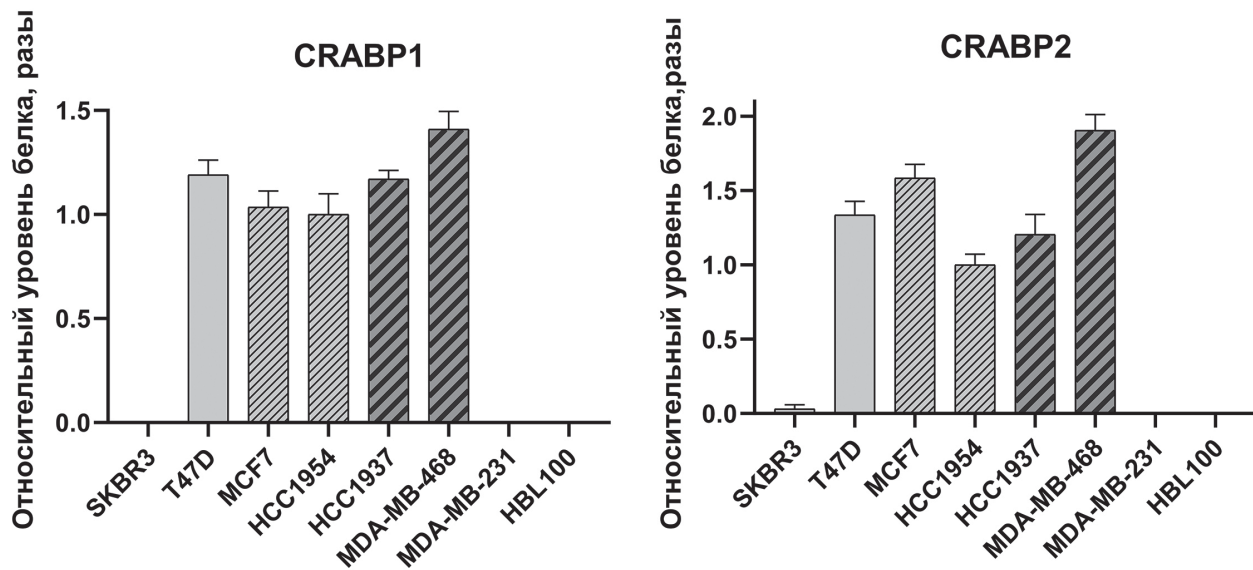
а**б**

Рис. 1. Анализ экспрессии CRABP1 и CRABP2 в линиях клеток РМЖ с разным уровнем PK-чувствительности. *а* – Сравнение уровня экспрессии мРНК *CRABP1* и *CRABP2* методом ОТ-ПЦР РВ. За единицу брали значение относительного уровня экспрессии мРНК *CRABP* в клетках SKBR3. Стрелкой иллюстрировано возрастание уровня PK-резистентности. *б* – Сравнение продукции белков CRABP в исследуемых линиях РМЖ (денситометрический анализ результатов иммуноблоттинга [29]). Статистически значимыми считали значения $p < 0,05$ (на рисунке обозначены как «*»)

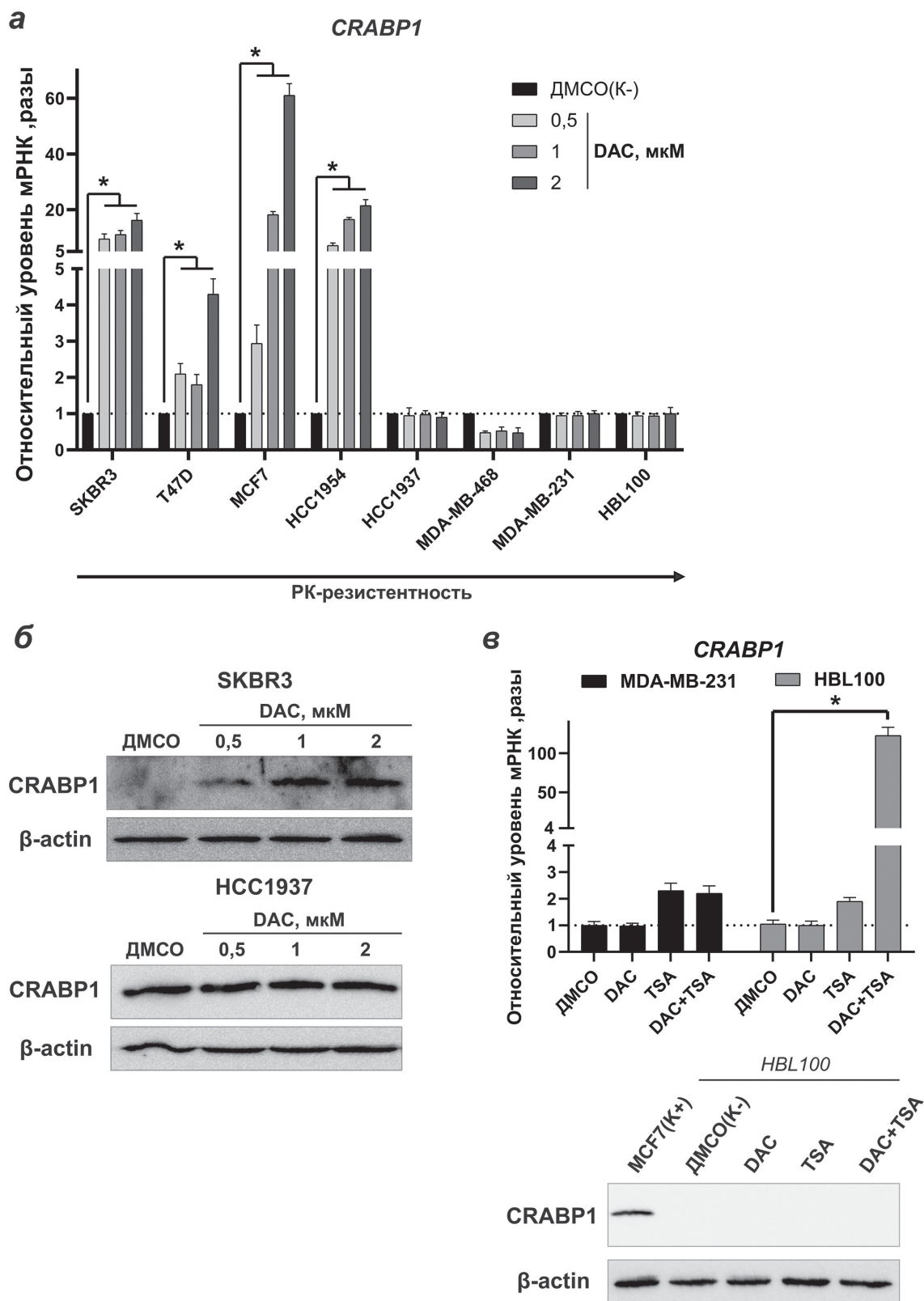


Рис. 2. Анализ экспрессии CRABP1 в клетках РМЖ после обработки DAC и TSA. *а* – Уровень экспрессии мРНК *CRABP1* до и после обработки DAC. Стрелкой иллюстрировано возрастание уровня РК-резистентности. *б* – Продукция белка CRABP1 после обработки DAC в клетках SKBR3 (пример восстановления) и HCC1937 (пример отсутствия увеличения). *в* – Влияние DAC, TSA и комбинации DAC + TSA на экспрессию мРНК *CRABP1* в клетках MDA-MB-231 и HBL100. В качестве примера отсутствия индукции экспрессии приведены результаты анализа экспрессии белка CRABP1 в клетках HBL100. Статистически значимыми считали значения $p < 0,05$ (на рисунке обозначены как «*»). DAC – 5-Аза-2'-дезоксифосфат, TSA – трихостатин А

HBL100 с TSA или с DAC + TSA в комбинации не индуцировала продукцию белка CRABP1. В клетках MDA-MB-231 продукция белка CRABP1 при обработке TSA или DAC + TSA ожидаемо не детектировалась (рис. 2, в).

Таким образом, увеличение экспрессии *CRABP1* при деметилировании наблюдалось во всех исследованных РК-чувствительных и не детектировалось в РК-резистентных линиях РМЖ (как в полностью РК-резистентных (MDA-MB-231 и HBL100), так и в клетках с промежуточным уровнем РК-резистентности (MDA-MB-468 и HCC1937). В последнем случае такой эффект объясняется, очевидно, отсутствием метилирования гена *CRABP1*, учитывая, что все эти клетки демонстрируют высокий уровень мРНК и белка CRABP1. В пользу такого объяснения говорит и то, что среди РК-чувствительных клеток минимальное деметилирование наблюдалось в клетках T47D с максимальным (среди РК-чувствительных клеток) уровнем базовой экспрессии *CRABP1*. В максимально-резистентных клетках эпигенетическое молчание *CRABP1* реализуется, по-видимому, с помощью нескольких механизмов регуляции транскрипции, а также на посттранскрипционном уровне (как в случае HBL100).

В РК-чувствительных клетках белки CRABP1 и CRABP2 оказывают противоположное влияние на рост и выживание в присутствии ATRA; в полностью РК-резистентных клетках оба гомолога не влияют на исследуемые характеристики. На основании полученных результатов мы предположили, что связь CRABP1 с РК-чувствительностью может быть более сложной, и ее характер может, по-видимому, меняться в зависимости от исходного уровня чувствительности/резистентности к РК, гормонального статуса, степени малигнизации клеток и других факторов. В связи с этим мы исследовали влияние его экспрессии на РК-чувствительность, а также на скорость роста в стандартных условиях (показатель уровня малигнизации) клеток РМЖ с различным исходным уровнем РК-чувствительности и различным гормональным статусом.

В РК-чувствительных клетках РМЖ *CRABP1* стимулирует, а *CRABP2* подавляет рост и выживание в присутствии ATRA. Ранее мы показали, что экзогенная экспрессия CRABP1 в максимально-чувствительной линии SKBR3 приводит к увеличению пролиферации и уровня РК-резистентности клеток [31]. Для проверки универсальности этого эффекта в данной работе мы выбрали средне-чувствительную линию MCF7. Поскольку

в клетках MCF7 мРНК *CRABP1* детектировалась на крайне низком уровне, влияние CRABP1 оценивали с помощью гиперэкспрессии. Проверка эффективности трансфекции показала трехкратное увеличение уровня белка CRABP1 в производной сублинии по сравнению с контрольной сублинией клеток MCF7pLXSN (рис. 3, а). Анализ роста клеток в стандартных условиях культивации и в присутствии ATRA показал, что гиперэкспрессия CRABP1 привела к достоверному повышению пролиферации и усилению РК-резистентности (рис. 3, а). Таким образом, в линии MCF7, как и в клетках SKBR3, CRABP1 способствует малигнизации и снижает РК-чувствительность. Данные результаты согласуются с гипотетической ролью CRABP1 в поддержании РК в неактивном состоянии (секвестрировании в цитоплазме) и «противодействии» CRABP2, который, согласно большинству литературных данных, является супрессором роста опухолей, проводящим РК-зависимый дифференцировочный, апоптотический и антипролиферативный сигналинг.

Для проверки этого предположения и определения функционального значения CRABP2 мы исследовали его влияние на те же характеристики тех же клеток SKBR3 и MCF7. В клетках SKBR3, характеризующихся крайне низкой экспрессией CRABP2 и CRABP1, влияние CRABP2 оценивали также с помощью анализа эффекта экзогенной экспрессии. Высокий уровень экспрессии CRABP2 в полученной сублинии подтвердил эффективность трансдукции (рис. 3, б). Увеличение экспрессии CRABP2 привело к снижению пролиферации клеток SKBR3 и сделало их еще более чувствительными к действию РК, т.е. эффект гиперэкспрессии CRABP2 оказался противоположным тому, который оказывала гиперэкспрессия CRABP1 в тех же клетках, а также в клетках MCF7.

В клетках MCF7 исходный уровень экспрессии мРНК *CRABP2* (в отличие от *CRABP1*) был достаточно высоким (рис. 1, а) для проведения нокдауна (предпочтительный метод, позволяющий более эффективно оценить роль исследуемого белка). Подавление эндогенной экспрессии (нокдаун) *CRABP2* в клетках MCF7 проводили с помощью трансдукции последовательностей малых шпилечных РНК к *CRABP2* (sh1 и sh2, последовательности приведены в табл. П2 в Приложении) в составе лентивирусного вектора pLKO.1-puro. Оценка эффективности показала снижение уровня белка в 5 раз в обеих стабильных производных сублиниях MCF7 (sh1CRABP2

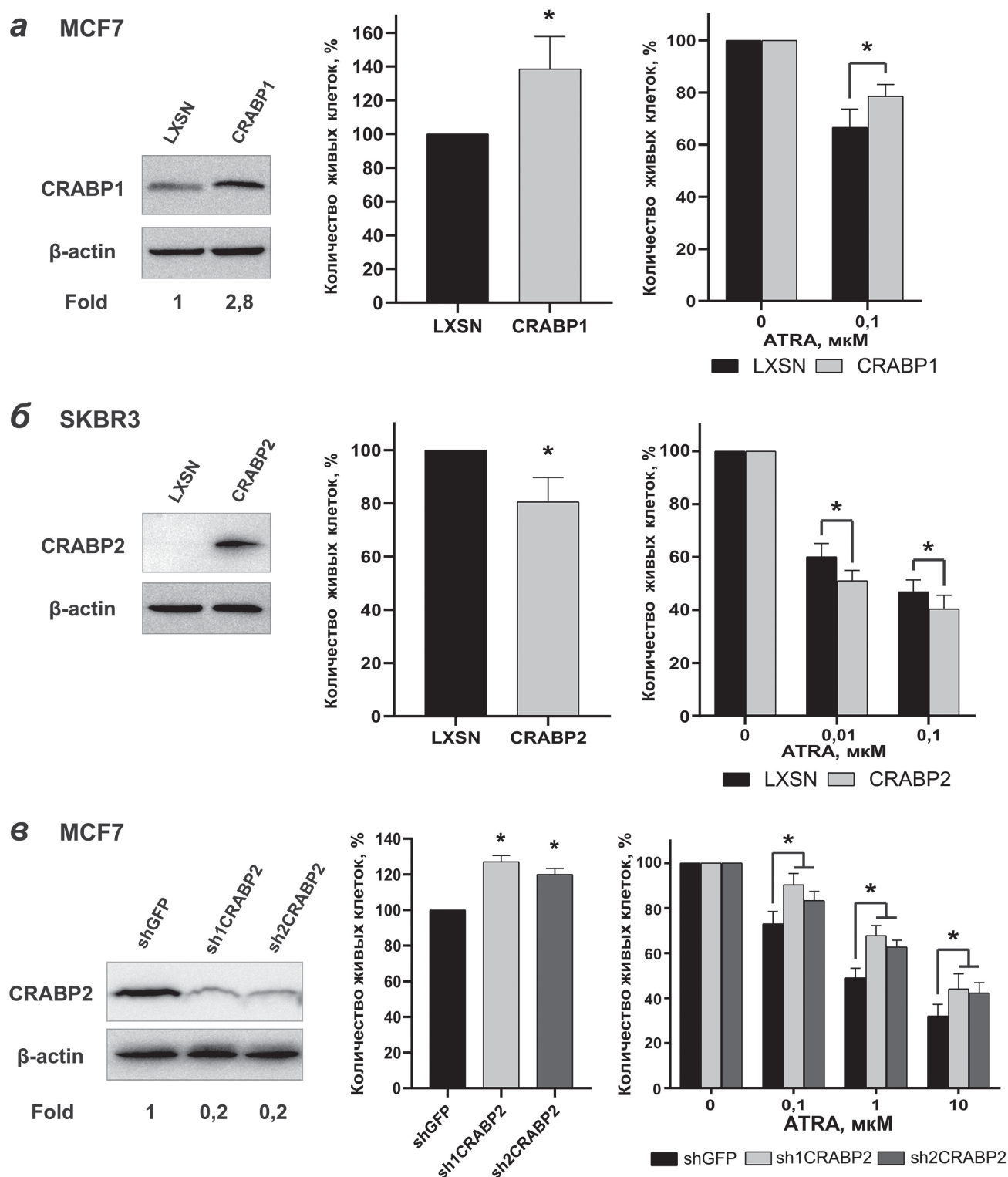


Рис. 3. Влияние модификации экспрессии CRABP на пролиферацию и РК-чувствительность клеток MCF7 и SKBR3. *а* – Влияние гиперэкспрессии CRABP1 на пролиферацию клеток MCF7 в стандартных условиях и в присутствии ATRA. *б* – Влияние гиперэкспрессии CRABP2 на пролиферацию клеток SKBR3 в стандартных условиях и в присутствии ATRA. *в* – Влияние нокдауна *CRABP2* на пролиферацию клеток MCF7 в стандартных условиях и в присутствии ATRA. Количество живых клеток в контрольной линии было принято за 100%; цифрами указаны результаты денситометрического анализа с учетом значений экспрессии белка домашнего хозяйства, β-актина («Fold»). Статистически значимыми считали значения $p < 0,05$ (на рисунке обозначены как «*»). Каждая панель (*а–в*) состоит из трех частей: в левой части представлены результаты анализа продукции белков CRABP в производных субклинах методом иммуноблоттинга; в центральной части представлены результаты анализа пролиферации клеток в стандартных условиях; в правой части представлены результаты пролиферации клеток в присутствии ATRA

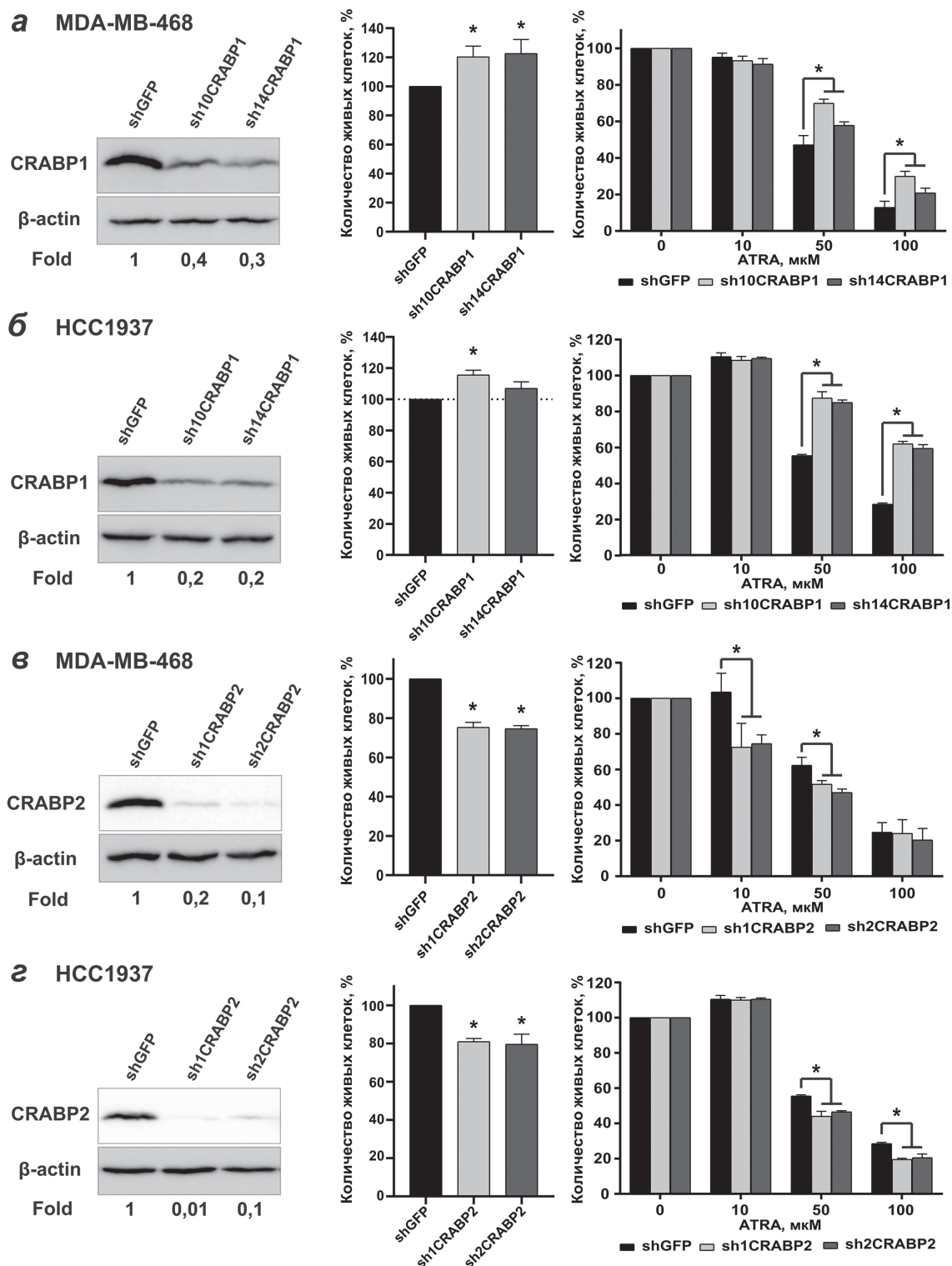


Рис. 4. Влияние нокдауна *CRABP* на пролиферацию и РК-чувствительность средне-резистентных клеток MDA-MB-468 и HCC1937. *а* – Влияние нокдауна *CRABP1* на пролиферацию клеток MDA-MB-468 в стандартных условиях и в присутствии ATRA. *б* – Влияние нокдауна *CRABP1* на пролиферацию клеток HCC1937 в стандартных условиях и в присутствии ATRA. *в* – Влияние нокдауна *CRABP2* на пролиферацию клеток MDA-MB-468 в стандартных условиях и в присутствии ATRA. *г* – Влияние нокдауна *CRABP2* на пролиферацию клеток HCC1937 в стандартных условиях и в присутствии ATRA. Количество живых клеток в контрольной линии было принято за 100%; цифрами указаны результаты денситометрического анализа с учетом значений экспрессии белка домашнего хозяйства, β -актина («Fold»). Статистически значимыми считали значения $p < 0,05$ (на рисунке обозначены как «*»). Каждая панель (*а–г*) состоит из трех частей: в левой части представлены результаты анализа продукции белков *CRABP* в производных субклинах методом иммуноблоттинга; в центральной части представлены результаты анализа пролиферации клеток в стандартных условиях; в правой части представлены результаты пролиферации клеток в присутствии ATRA.

и sh2CRABP2) по сравнению с контрольной сублинией MCF7 shGFP (рис. 3, в). Сравнение роста в стандартных условиях и выживания в присутствии ATRA показало, что подавление CRABP2 привело к повышению как пролиферации, так и РК-резистентности (рис. 3, в) клеток обеих производных сублиний. Это означает, что нокдаун *CRABP2* оказывает эффект, аналогичный тому, который вызывает гиперэкспрессия *CRABP1* в тех же клетках MCF7 (а также в клетках SKBR3, как было показано нами ранее). Данные результаты свидетельствуют о том, что в РК-чувствительных клетках CRABP1 и CRABP2 выполняют противоположные функции в контексте проведения ретинового сигналинга и в опухолевой прогрессии, что подтверждает приведенную выше гипотезу.

В средне-резистентных клетках РМЖ *CRABP1* подавляет, а *CRABP2* стимулирует рост и выживание в присутствии ATRA. Далее мы исследовали влияние обоих гомологов CRABP на те же показатели роста и выживаемости РК-резистентных клеток, которые относятся к трижды негативному типу РМЖ. Для этой задачи были выбраны две средне-резистентные линии, HCC1937 и MDA-MB-468. В соответствии с исходным уровнем РК-чувствительности эти линии обладают наиболее высоким потенциалом изменения как в сторону понижения, так и в сторону повышения РК-чувствительности. Кроме того, в этих линиях оба гомолога CRABP демонстрируют исходно высокий уровень как мРНК, так и белка, что позволило провести подавление экспрессии и оценить эффект нокдауна каждого из генов на пролиферацию и РК-резистентность. Нокдаун *CRABP1* в клетках HCC1937 и MDA-MB-468 проводили с помощью аналогичного подхода, для чего использовали последовательности sh10 и sh14 к *CRABP1* (последовательности приведены в табл. П2 в Приложении), которые были клонированы в тот же лентивирусный вектор pLKO.1-puro и трансдуцированы с помощью псевдолентивирусной инфекции. Проверка эффективности нокдауна *CRABP1* показала снижение уровня белка в 2,5 и 3,3 раза в производных сублиниях MDA-MB-468, sh10CRABP1 и sh14CRABP1 соответственно, а также в 5 раз — в обеих производных сублиниях HCC1937, sh10CRABP1 и sh14CRABP1 (рис. 4, а и б).

К нашему удивлению, нокдаун *CRABP1* в обоих случаях привел к увеличению пролиферации и повышению РК-резистентности клеток (рис. 4, а и б). В одной из сублиний HCC1937 sh14CRABP1 разница в пролифе-

рации не достигала статистической значимости, однако тенденция увеличения пролиферации была аналогичной сублинии HCC1937 sh10CRABP1. Важно отметить, что нокдаун *CRABP1* вызвал сходный эффект в обеих линиях, HCC1937 и MDA-MB-468, и сопоставленно повлиял на обе характеристики, усиливая рост и выживание клеток. Полученные данные означают, что в РК-резистентных клетках функциональное значение CRABP1 меняется на противоположное — он оказывает рост-супрессирующее воздействие на опухоли и способствует РК-чувствительности.

В связи с полученными результатами вопрос о том, какое влияние на пролиферацию и РК-резистентность тех же клеток оказывает CRABP2, представлялся особенно интересным. Проверка эффективности нокдауна показала снижение белка CRABP2 в 5 и 10 раз в производных сублиниях MDA-MB-468 sh1CRABP2 и MDA-MB-468 sh2CRABP2, а также примерно в 100 и в 10 раз — в производных сублиниях HCC1937 sh1CRABP2 и HCC1937 sh2CRABP2 соответственно (рис. 4, в и г). Нокдаун *CRABP2* в обеих линиях привел к снижению как пролиферации, так и РК-резистентности (рис. 4, в и г), т.е. обе характеристики опять изменились сопоставленно, но в противоположном направлении по сравнению с эффектом нокдауна *CRABP1*. Причем в случае MDA-MB-468 значимые различия в количестве живых клеток обеих сублиний (sh1 и sh2) наблюдались уже при 10 мкМ ATRA, а при инкубации со 100 мкМ — терялись (по-видимому, за счет неспецифической гибели клеток), а в производных линиях HCC1937 — различия наблюдались с 50 мкМ ATRA и выше. Таким образом, подавление продукции белков CRABP1 и CRABP2 в обеих РК-резистентных линиях (HCC1937 и MDA-MB-468) оказывало противоположный эффект как в отношении пролиферации, так и РК-чувствительности. Эти результаты подтверждают данные, полученные на РК-чувствительных линиях MCF7 и SKBR3, и свидетельствуют о противоположном функциональном значении CRABP1 и CRABP2 в отношении исследуемых характеристик. В то же время мы видим, что направленность воздействия каждого из белков CRABP как в отношении пролиферации, так и РК-чувствительности меняется на противоположное в РК-резистентных по сравнению с РК-чувствительными клетками.

***CRABP1* и *CRABP2* не влияют на рост и выживание в присутствии ATRA максимально-резистентных клеток РМЖ.** Далее мы оценили влияние обоих гомологов на исследуемые

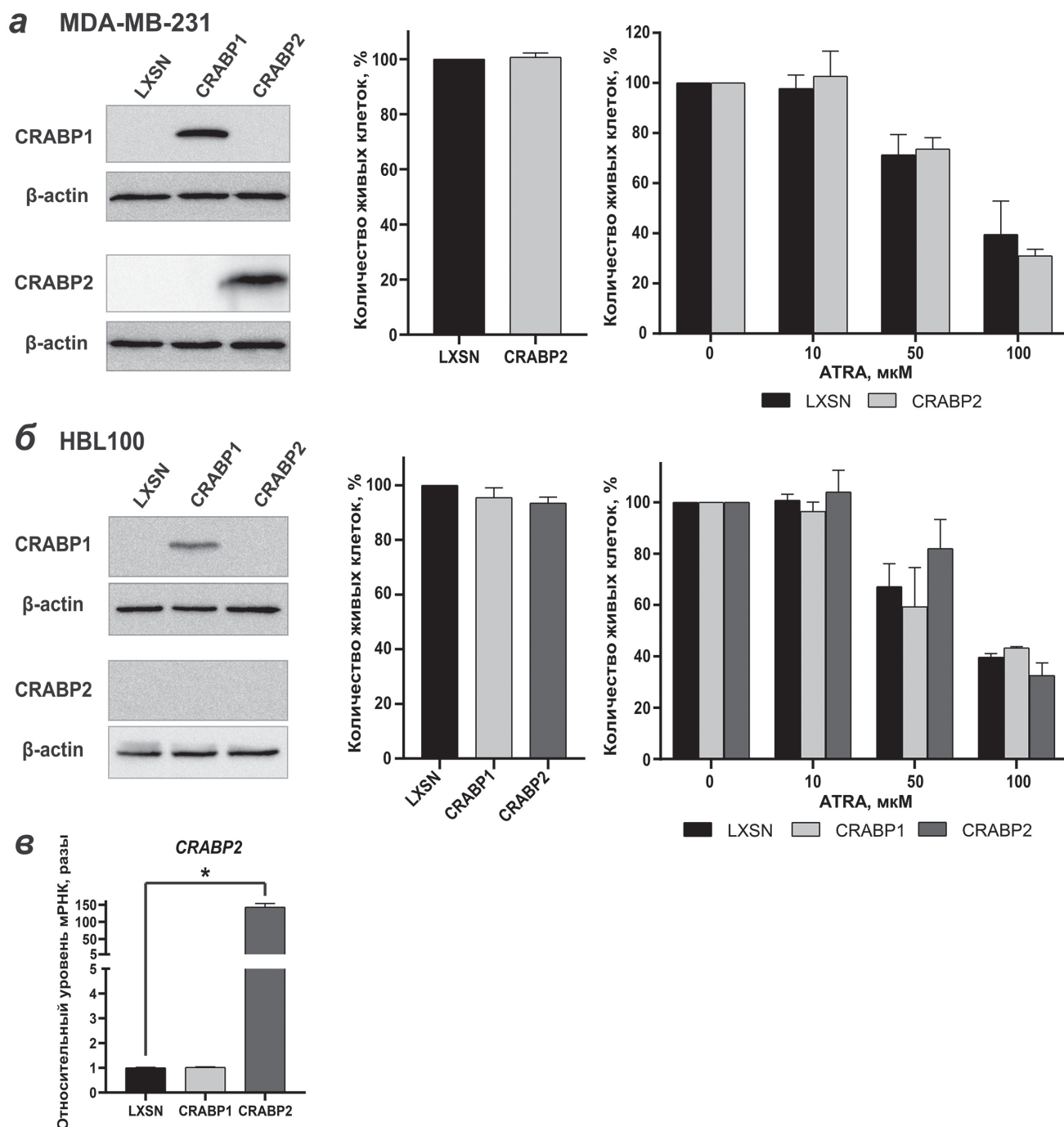


Рис. 5. Влияние гиперэкспрессии CRABP на пролиферацию и РК-чувствительность клеток MDA-MB-231 и HBL100. *а* – Влияние гиперэкспрессии CRABP2 на пролиферацию клеток MDA-MB-231 в стандартных условиях и в присутствии ATRA. *б* – Влияние гиперэкспрессии гомологов CRABP на пролиферацию клеток HBL100 в стандартных условиях и в присутствии ATRA. *в* – Сравнение экспрессии мРНК *CRABP2* в производных сублиниях HBL100. Панели *а* и *б* состоят из трех частей: в левой части представлены результаты анализа продукции белков CRABP в производных сублиниях методом иммуноблоттинга, в центральной части представлены результаты анализа пролиферации клеток в стандартных условиях, в правой части представлены результаты пролиферации клеток в присутствии ATRA. Отсутствие влияния CRABP1 на те же характеристики клеток MDA-MB-231 показано ранее [31]. Статистически значимыми считали значения $p < 0,05$ (на рисунке обозначены как «*»)

характеристики «максимально-резистентных» клеток MDA-MB-231 и HBL100. Крайне низкий уровень мРНК, а также полное отсутствие продукции белков CRABP1 и CRABP2 не по-

зволяло провести нокдаун, поэтому в данных клетках, как и в случае с CRABP1 в клетках MCF7 и SKBR3, роль каждого из белков исследовали с помощью экзогенной экспрессии.

Таблица 2. 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			
Гормональный статус	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

Примечание. н/и — нет информации (в связи с отсутствием продукции белка CRABP2 при гиперэкспрессии мРНК *CRABP2*).

Результаты гиперэкспрессии CRABP1 в клетках MDA-MB-231 были получены и опубликованы ранее [31]. Согласно этим данным, экспрессия *CRABP1* не повлияла на исследуемые характеристики. Гиперэкспрессия *CRABP2* в клетках MDA-MB-231 также не привела к изменениям роста и РК-резистентности (рис 5, а). Аналогичные результаты после трансдукции обоих генов получены и для линии HBL100. При этом важно отметить, что трансдукция *CRABP2*, в отличие от *CRABP1*, в клетки HBL100 не привела к продукции белка, несмотря на более чем 100-кратное увеличение уровня мРНК *CRABP2*, по данным ПЦР-РВ в трех независимо полученных производных сублиниях (рис. 5, б). Суммируя полученные данные, можно сделать вывод о том, что в максимально-резистентных линиях трижды-негативного РМЖ, характеризующихся отсутствием экспрессии обоих гомологов, экзогенная экспрессия как *CRABP1*, так и *CRABP2* не влияет на пролиферацию и РК-чувствительность. Важно отметить, что гиперэкспрессия *CRABP2* как в клетках MDA-MB-231, так и в HBL100 не повлияла на продукцию CRABP1, и наоборот. Эти результаты свидетельствуют об утрате максимально-резистентными клетками взаимосвязи между экспрессией двух гомологов CRABP, ранее показанной нами для клеток РК-чувствительных и средне-резистентных линий [29].

Результаты исследования влияния экспрессии белков CRABP1 и CRABP2 на пролиферацию и РК-чувствительность клеток РМЖ обобщены в табл. 2.

Ниже представлены выводы, обобщающие полученные результаты.

1) Во всех исследованных клетках, чувствительных к РК, экспрессия *CRABP1* на уровне

мРНК ингибируется метилированием гена, при этом количество белка сильно варьирует — от отсутствия до высокого уровня, обусловленного в большей степени не продукцией, а, вероятно, высокой стабильностью продукта. В средне-резистентных линиях наблюдается высокий уровень экспрессии CRABP1 как на уровне мРНК, так и белка, не изменяющийся в ответ на ингибирование метилирования. Максимально-резистентные линии характеризуются глубокой репрессией *CRABP1*, реализуемой с участием нескольких различных механизмов, включая подавление транскрипции и посттранскрипционную регуляцию.

2) Экспрессия CRABP1 и CRABP2 на белковом уровне коррелирует между собой во всех исследуемых линиях ($r = 0,8921$, $p < 0,0001$).

3) Белки CRABP1 и CRABP2 обладают противоположным функциональным значением в аспекте опухолевой прогрессии (пролиферации клеток) и регуляции РК-чувствительности/резистентности: в РК-чувствительных клетках CRABP1 играет роль опухолевого промотора и способствует РК-резистентности, а CRABP2 — супрессора опухолевого роста и способствует РК-чувствительности, в то время как в более РК-резистентных роль обоих гомологов меняется на обратную.

4) В максимально-резистентных клетках, характеризующихся глубокой репрессией обоих гомологов, экзогенная экспрессия каждого из гомологов не оказывает влияние на исследуемые характеристики. В этих же клетках утрачивается и показанная нами ранее регуляторная связь данных гомологов (CRABP2-зависимая регуляция продукции CRABP1).

Гипотетическая модель участия CRABP1 и CRABP2 в опухолевой прогрессии и РК-резистентности приведена на рис. 6.

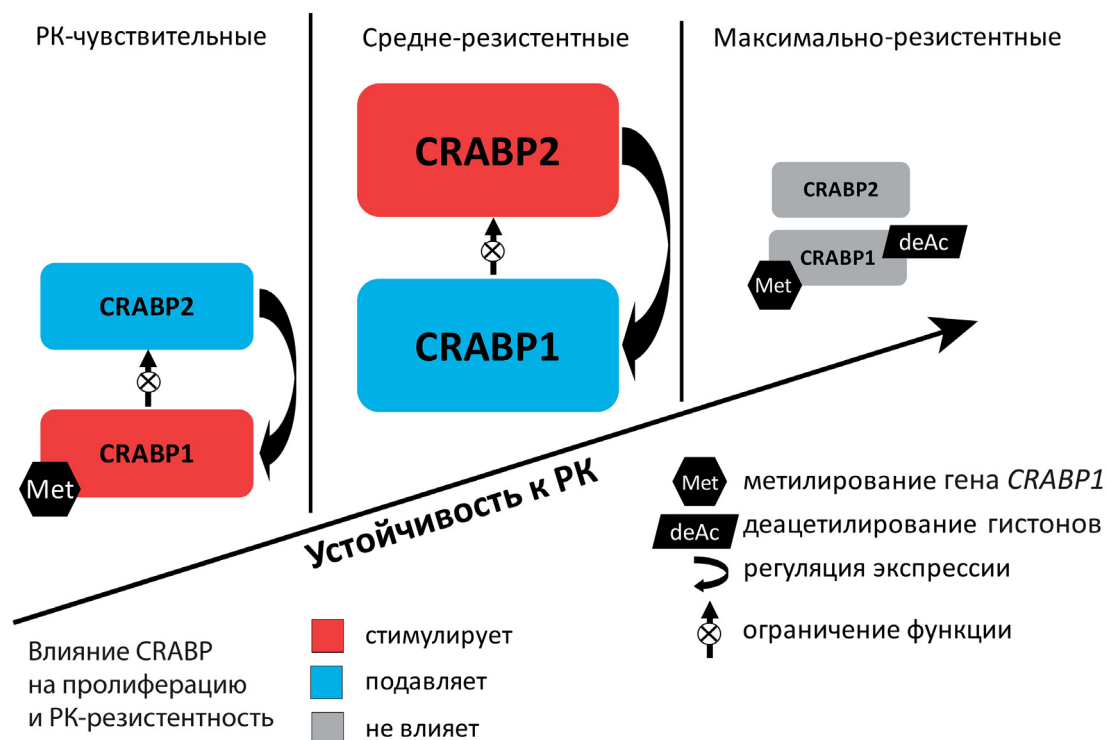


Рис. 6. Гипотетическая модель связи экспрессии CRABP1 и CRABP2 с опухолевой прогрессией и ПК-резистентностью. Цветными фигурами обозначены белки CRABP1 и CRABP2, размер отражает изменение уровня экспрессии. Цвет обозначает роль в пролиферации и ПК-резистентности клеток. Стрелками указаны регуляция экспрессии и функциональное влияние. Пояснения – в тексте

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Несмотря на то что белки-шапероны CRABP являются важнейшими медиаторами активности ПК и ПК-зависимой регуляции транскрипции, до сих пор механизмы их участия в ретиновой сигнализации остаются не полностью понятными. В частности, остается открытым вопрос о сходстве или различиях функционального значения CRABP1 и CRABP2 в реализации транскрипционной активности ПК. Так, если основная роль CRABP2, связанная с транспортом ПК, относительно понятна (для этого белка показаны и ПК-независимые функции [18, 32]) и заключается в доставке ПК в ядро и передаче ее ядерным рецепторам, то вопрос о роли CRABP1 до сих пор остается открытым. Наиболее убедительной представляется гипотеза, согласно которой основная функция данного белка может быть связана с удержанием (секвестрированием) ПК в цитоплазме и тем самым временным ограничением ее активности. Такой гипотетический механизм является достаточно экономичным способом регуляции внутриклеточной активности ПК, позволяя «депонировать» ПК при ее избытке и использовать – при недостатке или повышении потребности. В этом смысле

функциональное значение белков CRABP1 и CRABP2 можно считать противоположным, что косвенно подтверждается некоторыми литературными данными [16, 33, 34]. Еще менее понятна роль белков CRABP в малигнизации клеток. Так, несмотря на то что участие обоих гомологов в канцерогенезе и опухолевой прогрессии показана во многих исследованиях [23, 30, 32, 35–37], данные о функциональном значении каждого из белков очень противоречивы [38]. Наконец, еще одним вопросом, особенно актуальным в контексте возможного использования ПК или других ретиноидов в терапии онкологических заболеваний, является вопрос об участии белков CRABP в формировании ПК-резистентности.

Ранее мы показали, что в опухолях, относящихся в целом к ПК-резистентным типам рака (немелкоклеточный рак легкого, глиобластома, рак яичника и др.), продукция белка CRABP1 практически отсутствует, в то время как в ПК-чувствительных опухолях (прежде всего нейробластома) CRABP1 экспрессируется на высоком уровне [29]. Более того, при сравнении клеток рака яичника с разной степенью ПК-резистентности оказалось, что максимально-резистентные линии OVCAR8, SK-OV-3 и EFO-21 характеризуются отсутствием

белка CRABP1, в то время как в менее устойчивых линиях OVCAR3 и OVCAR4 он детектируется на достаточно высоком уровне [39]. Исследование клеток РМЖ также показало, что в большинстве РК-чувствительных клеток продукция CRABP1 присутствовала, а в максимально-резистентных — отсутствовала [29]. Все это указывает на связь CRABP1 с РК-чувствительностью.

В данной работе с использованием той же панели клеточных линий РМЖ мы проанализировали возможную связь экспрессии мРНК *CRABP1* с РК-чувствительностью и выяснили, что картина сильно сложнее и связана с различным уровнем репрессии (легко обратимом и практически необратимом) *CRABP1*. Действительно, 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, т.е. в этих клетках происходит глубокая репрессия транскрипции. Интересно, что в клетках HBL100 экспрессия восстанавливается при обработке комбинацией DAC + TSA, причем такое сочетание приводит к увеличению уровня мРНК практически на 2 порядка. Это может означать, что в данной линии клеток в подавлении транскрипции *CRABP1* задействованы оба механизма — метилирование гена *CRABP1* и деацетилирование гистонов. Соответственно, при инкубации с обоими реагентами деконденсация хроматина открывает доступ деметилазам, после чего экспрессия может восстанавливаться. Но даже и в этом случае продукция белка CRABP1 не восстанавливается, что означает, что в клетках HBL100 присутствует дополнительная блокировка экспрессии *CRABP1* на посттранскрипционном уровне (трансляционном или посттрансляционном). Об этом же свидетельствуют и результаты экзогенной экспрессии *CRABP2* в данной линии — трансдукция гена привела к увеличению уровня мРНК *CRABP2* на 2 порядка, однако белок по-прежнему не детектировался. Возможно, это также связано с наличием механизма, блокирующего продукцию гомологов CRABP. В другой максимально-резистентной линии, MDA-MB-231, экспрессия мРНК не восстанавливается даже при сочетании DAC + TSA, это говорит о том, что в данных клетках эпигенетическая репрессия осуществляется на еще более глубоком транскрипционном уровне. Таким образом, в максимально-резистентных клетках происходит глубокая и, по-видимому, необратимая репрессия экспрессии мРНК, осуществляемая

с помощью нескольких механизмов регуляции на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях.

Согласно нашей гипотезе, опухолевым клеткам, чувствительным к РК, белок CRABP1 необходим для защиты от рост-ингибирующей активности РК, причем они могут либо экспрессировать CRABP1 изначально, либо индуцировать экспрессию при увеличении внутриклеточной концентрации РК, в то время как полностью РК-резистентным клеткам активность CRABP1 становится не актуальной, поскольку им не угрожает избыток РК — он не приведет к подавлению их роста. В пользу этой гипотезы свидетельствуют полученные результаты деметилирования ДНК, которые показали, что в РК-чувствительных клетках, в отличие от РК-резистентных, происходит восстановление экспрессии CRABP1. В средне-резистентных клетках увеличения экспрессии не происходит (по-видимому, за счет исходно высокого уровня и отсутствия метилирования), а в максимально-резистентных клетках происходит глубокая репрессия *CRABP1*, осуществляемая на разных уровнях эпигенетической регуляции. Следует отметить, что в РК-чувствительных клетках регуляция экспрессии CRABP1 тоже различается. Так, в клетках SKBR3 исходно низкий уровень белка соответствует низкому уровню мРНК, и обе характеристики возрастают в результате деметилирования. Другая высокочувствительная 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-чувствительных линиях, MCF7 и HCC1954, наблюдается иная картина — при высоком уровне белка мРНК детектируется на крайне низком уровне. Такой странный результат можно объяснить низкой стабильностью мРНК в сочетании с высоким периодом полужизни белка, что, в свою очередь, может вызываться низким уровнем протеолитической деградации и другими причинами. В этой связи крайне интересными представляются результаты исследования структурно-функциональных особенностей белков семейства iIbP. В частности, для CRABP1 (и только для него) показано, что данный белок вследствие особенностей своей структуры подвержен агрегации («Aggregation propensity») — необратимому процессу, 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 [40–43]. Таким образом, РК-чувствительные клетки «используют» различные методы для регуляции уровня белка CRABP1 и возможности быстрой индукции его экспрессии. Регуляция внутриклеточного уровня CRABP1 в РК-чувствительных клетках может осуществляться и за счет его секреции в экстраклеточные везикулы. Так, согласно нашим (пока неопубликованным) данным, CRABP1 обнаруживается в составе малых экстраклеточных везикул, секретируемых РК-чувствительными клетками РМЖ.

Мы также подтвердили показанные нами ранее данные о том, что экспрессия двух гомологов коррелирует между собой на уровне белка в клетках РМЖ [29], более того, эта корреляция имеет место и в тканях первичных опухолей, причем как на уровне мРНК, так и на уровне белка, что было показано нами ранее для немелкоклеточного рака легких. Примечательно то, что эта корреляция утрачивается в ходе опухолевой прогрессии на поздних стадиях заболевания [22]. Ранее мы также показали, что продукция CRABP1 и CRABP2 взаимосвязаны, причем CRABP2 является «upstream» регулятором CRABP1 [29].

Для ответа на вопрос о функциональном значении белков CRABP в РК-чувствительности/резистентности и малигнизации клеток мы далее провели исследование по направленной модификации экспрессии каждого из гомологов в линиях клеток РМЖ с исходно разным уровнем РК-чувствительности. Для исследования были выбраны по 2 линии из категории РК-чувствительных, средне-резистентных и максимально-резистентных. Суммируя полученные данные, можно сделать следующие выводы: а) CRABP1 и CRABP2 не влияют на обе исследуемые характеристики максимально-резистентных клеток; 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.

Такие результаты являются достаточно неожиданными, однако в действительности хорошо укладываются в указанную выше концепцию, а также объясняют противоречия, имеющиеся в литературе. Так, несмотря на то что CRABP2 принято считать, скорее, супрессором опухолевого роста [32, 44, 45], есть масса примеров противоположной роли данно-

го белка в опухолевой прогрессии [18, 19, 21]. Хотя роль CRABP1 исследована значительно меньше, согласно нашим и некоторым литературным данным, он играет роль промотора опухолей [23, 30, 46]. Вместе с тем в клетках нейробластомы (наиболее РК-чувствительном типе опухолей), согласно нашим данным, экспрессия CRABP1 коррелирует с высокой степенью дифференцировки [47], которая, в свою очередь, связана с благоприятным прогнозом. Есть и ряд других данных, свидетельствующих в пользу роли CRABP1 как супрессора роста опухолей [48, 49]. 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 работа Liu et al. [16], в которой впервые было сделано предположение о противоположной функции белков CRABP1 и CRABP2 в прогрессии РМЖ. Авторы работы предположили, что CRABP1 ограничивает доступ CRABP2 к РК и препятствует проведению CRABP2-зависимого сигналинга в реализации дифференцировочной и про-апоптотической функции РК. Авторы связывают этот эффект с той же активностью CRABP1 — секвестрированием РК в цитоплазме. Результаты нашей работы хорошо укладываются в такую гипотезу, напрямую подтверждая такое предположение для каждого из гомологов в случае РК-чувствительных клеток. Однако как может объясняться тот факт, что в РК-резистентных клетках при сохранении противоположной роли белков CRABP1 и CRABP2 направленность этой роли (т.е. функциональное значение каждого из гомологов) меняется на обратную? 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 [7]. Предполагается, что передача РК по пути CRABP2/RAR α приводит к РК-зависимой активации транскрипции ретиноид-респонсивных генов с дифференцировочной, проапоптотической и антипролиферативной активностью, в то время как активация каскада РК/FABP5/PPAR δ оказывает противоположный эффект [50, 51]. В связи с тем, что устройство ретиноевого сигналинга 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 [7]. В этом контексте можно предположить, что смена функциональной роли CRABP2 в РК-резистентных клетках связана с изменением РК-зависимого сигналинга, при котором активность данного белка приводит к активации транскрипции генов промоторов опухолей (антиапоптотических, пролиферативных и пр.). Это, в свою очередь, может быть вызвано изменением соотношения ядерных рецепторов РК. Такую гипотезу подтверждают наши недавно опубликованные данные, согласно которым в рамках панели тех же исследуемых линий РМЖ имеет место достоверная и сильная корреляция РК-чувствительности клеток с уровнем экспрессии RAR α [52]. В совокупности с представленными здесь результатами это означает, что в РК-чувствительных клетках наблюдается «классическая» картина РК-зависимого сигналинга, при которой CRABP2 передает РК рецепторам RAR α , что, в свою очередь, приводит к активации транскрипции генов супрессоров опухолей. Соответственно, снижение продукции данного белка способствует увеличению пролиферации и уровню малигнизации клеток. По мере опухолевой прогрессии происходит увеличение РК-резистентности, связанное со снижением экспрессии RAR α и, предположительно, с активацией других рецепторов РК. В таких клетках осуществляемый белком CRABP2 транспорт РК приводит к активации альтернативных рецепторов и стимуляции транскрипции генов промоторов опухолей.

Другая возможная причина смены функционального значения CRABP2 может быть связана с различиями в гормональном статусе клеток. Возможно, что в клетках трижды-негативного РМЖ CRABP2 выполняет роль промотора опухолей. О такой возможности (разной роли CRABP2 в клетках с разным гормональным статусом) свидетельствуют и некоторые литературные данные [21].

Что же касается CRABP1, 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 противоопухолевой активности CRABP2 и сни-

жает чувствительность к CRABP2-опосредуемой транскрипционной активности РК, а в более резистентных клетках, в которых CRABP2 выполняет роль промотора опухолей, 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. Более того, ранее показанная нами как для РК-чувствительных, так и для средне-резистентных клеток CRABP2-зависимая регуляция экспрессии CRABP1 утрачивается [29], поскольку гиперэкспрессия CRABP2 не приводит к увеличению продукции CRABP1. Эти данные согласуются с данными нашей цитируемой выше статьи, где была показана потеря корреляции экспрессии CRABP1 и CRABP2 в тканях немелкоклеточного рака легкого на поздних стадиях опухолевой прогрессии [22].

Согласно нашей гипотетической модели (представлена на схеме, рис. 6), в РК-чувствительных клетках РМЖ CRABP2 обладает супрессорной, а CRABP1 — промоторной активностью в отношении опухолевого роста, 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. Эти клетки также способны экскретировать белок CRABP1 в составе малых внеклеточных везикул, что, с одной стороны, может использоваться клетками для регулирования внутриклеточного количества белка; с другой стороны, с учетом показанной здесь рост-стимулирующей активности, может способствовать росту клеток микроокружения. В средне-резистентных клетках трижды-негативного РМЖ функциональное значение белков CRABP меняется на противоположное: CRABP2 обладает промоторной, а CRABP1 — супрессорной активностью в отношении опухолей, при этом сохраняется CRABP2-зависимая регуляция экспрессии CRABP1 [29] и противоположная роль гомологов в проведении РК-сигналинга. Экспрессия на уровне мРНК CRABP2 и CRABP1 максимальная, метилирование гена CRABP1 — минимально. В максимально-резистентных клетках трижды-негативного РМЖ продукция белков CRABP не детектируется, транскрипция CRABP1 репрес-

сируется на нескольких уровнях. Взаимосвязь экспрессии белков CRABP и их функциональное значение в опухолевой прогрессии и РК-чувствительности утрачиваются.

Вклад авторов. А.Д. Еникеев — получение экспериментальных данных, анализ литературы, написание статьи; П.М. Абрамов, Д.С. Елкин, А.В. Комельков, А.А. Беляева, Д.М. Силантьева — получение экспериментальных данных, Е.М. Чевкина — дизайн исследования, анализ результатов, редактирование рукописи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-15-00373).

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.

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yilmaz, M., Kantarjian, H., and Ravandi, F. (2021) Acute promyelocytic leukemia current treatment algorithms, *Blood Cancer J.*, **11**, 123, doi: 10.1038/s41408-021-00514-3.
2. Siddikuzzaman, Guruvayoorappan, C., and Berlin Grace, V. M. (2011) All *trans* retinoic acid and cancer, *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, **33**, 241-249, doi: 10.3109/08923973.2010.521507.
3. Choi, Y., Kim, S. Y., Kim, S. H., Yang, J., Park, K., and Byun, Y. (2003) Inhibition of tumor growth by biodegradable microspheres containing all-*trans*-retinoic acid in a human head-and-neck cancer xenograft, *Int. J. Cancer*, **107**, 145-148, doi: 10.1002/ijc.11354.
4. Reynolds, C. P., Matthay, K. K., Villablanca, J. G., and Maurer, B. J. (2003) Retinoid therapy of high-risk neuroblastoma, *Cancer Lett.*, **197**, 185-192, doi: 10.1016/S0304-3835(03)00108-3.
5. David, M., Hodak, E., and Lowe, N. J. (1988) Adverse effects of retinoids, *Med. Toxicol. Adverse Drug Exp.*, **3**, 273-288, doi: 10.1007/BF03259940.
6. Campos, B., Weisang, S., Osswald, F., Ali, R., Sedlmeier, G., Bageritz, J., Mallm, J. P., Hartmann, C., von Deimling, A., Popanda, O., Goidts, V., Plass, C., Unterberg, A., Schmezer, P., Burhenne, J., and Herold-Mende, C. (2015) Retinoid resistance and multifaceted impairment of retinoic acid synthesis in glioblastoma, *Glia*, **63**, 1850-1859, doi: 10.1002/glia.22849.
7. 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.
8. Veerkamp, J. H., and Maatman, R. G. (1995) Cytoplasmic fatty acid-binding proteins: their structure and genes, *Prog. Lipid Res.*, **34**, 17-52, doi: 10.1016/0163-7827(94)00005-7.
9. 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.
10. Jing, Y., Waxman, S., and Mira-y-Lopez, R. (1997) The cellular retinoic acid binding protein II is a positive regulator of retinoic acid signaling in breast cancer cells, *Cancer Res.*, **57**, 1668-1672.
11. Tang, X.-H., Vivero, M., and Gudas, L. J. (2008) Overexpression of CRABPI in suprabasal keratinocytes enhances the proliferation of epidermal basal keratinocytes in mouse skin topically treated with all-*trans* retinoic acid, *Exp. Cell Res.*, **314**, 38-51, doi: 10.1016/j.yexcr.2007.07.016.
12. Persaud, S. D., Lin, Y. W., Wu, C. Y., Kagechika, H., and Wei, L. N. (2013) Cellular retinoic acid binding protein I mediates rapid non-canonical activation of ERK1/2 by all-*trans* retinoic acid, *Cell. Signalling*, **25**, 19-25, doi: 10.1016/j.cellsig.2012.09.002.
13. 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, doi: 10.1016/s0021-9258(19)36635-9.
14. Napoli, J. L. (1999) Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism, *Biochim. Biophys. Acta*, **1440**, 139-162, doi: 10.1016/S1388-1981(99)00117-1.
15. Boylan, J. F., and Gudas, L. J. (1991) 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. Cell Biol.*, **112**, 965-979, doi: 10.1083/jcb.112.5.965.
16. 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.
17. Yang, Q., Wang, R., Xiao, W., Sun, F., Yuan, H., and Pan, Q. (2016) Cellular retinoic acid binding protein 2

- is strikingly downregulated in human esophageal squamous cell carcinoma and functions as a tumor suppressor, *PLoS One*, **11**, e0148381, doi: 10.1371/journal.pone.0148381.
18. 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 neuroblastoma, *Cancer Res.*, **66**, 8100-8108, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4519.
 19. Liu, R. Z., Li, S., Garcia, E., Glubrecht, D. D., Yin Poon, H., Easaw, J. C., and Godbout, R. (2016) Association between cytoplasmic CRABP2, altered retinoic acid signaling, and poor prognosis in glioblastoma, *Glia*, **64**, 963-976, doi: 10.1002/glia.22976.
 20. Chen, Q., Tan, L., Jin, Z., Liu, Y., and Zhang, Z. (2020) Downregulation of CRABP2 inhibit the tumorigenesis of hepatocellular carcinoma *in vivo* and *in vitro*, *BioMed Res. Int.*, **2020**, 3098327, doi: 10.1155/2020/3098327.
 21. Feng, X., Zhang, M., Wang, B., Zhou, C., Mu, Y., Li, J., Liu, X., Wang, Y., Song, Z., and Liu, P. (2019) CRABP2 regulates invasion and metastasis of breast cancer through hippo pathway dependent on ER status, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **38**, 361, doi: 10.1186/s13046-019-1345-2.
 22. 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.
 23. Lu, Y., Lemon, W., Liu, P. Y., Yi, Y., Morrison, C., Yang, P., Sun, Z., Szoke, J., Gerald, W. L., Watson, M., Govindan, R., and You, M. (2006) A gene expression signature predicts survival of patients with stage I non-small cell lung cancer, *PLoS Med.*, **3**, 2229-2243, doi: 10.1371/journal.pmed.0030467.
 24. Hawthorn, L., Stein, L., Varma, R., Wiseman, S., Loree, T., and Tan, D. F. (2004) TIMP1 and SERPIN-A overexpression and TFF3 and CRABP1 underexpression as biomarkers for papillary thyroid carcinoma, *Head Neck*, **26**, 1069-1083, doi: 10.1002/hed.20099.
 25. Tanaka, K., Imoto, I., Inoue, J., Kozaki, K., Tsuda, H., Shimada, Y., Aiko, S., Yoshizumi, Y., Iwai, T., Kawano, T., and Inazawa, J. (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.
 26. Huang, Y., De la Chapelle, A., and Pellegata, N. S. (2003) Hypermethylation, but not LOH, is associated with the low expression of MT1G and CRABP1 in papillary thyroid carcinoma, *Int. J. Cancer*, **104**, 735-744, doi: 10.1002/ijc.11006.
 27. 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 irradiation, *Int. J. Radiat. Biol.*, **79**, 981-991, doi: 10.1080/09553000310001632949.
 28. Choi, W.-S., Liu, R.-Z., and Godbout, R. (2021) Abstract 1401: MYC mediates retinoic acid resistance by suppressing cellular retinoic acid-binding protein (CRABP2) transcription in HER2-enriched breast cancers, *Cancer Res.*, **81**, 1401-1401, doi: 10.1158/1538-7445.am2021-1401.
 29. Enikeev, A. D., Komelkov, A. V., Axelrod, M. E., Galetsky, S. A., Kuzmichev, S. A., and Tchevkina, E. M. (2021) CRABP1 and CRABP2 protein levels correlate with each other but do not correlate with sensitivity of breast cancer cells to retinoic acid, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 217-229, doi: 10.1134/S0006297921020103.
 30. Kainov, Y., Favorskaya, I., Delektorskaya, V., Chemeris, G., Komelkov, A., Zhuravskaya, A., Trukhanova, L., Zueva, E., Tavitian, B., Dyakova, N., Zborovskaya, I., and Tchevkina, E. (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.
 31. Enikeev, A. D., Komelkov, A. V., Axelrod, M. E., Galetsky, S. A., and Tchevkina, E. M. (2020) Effect of CRABP1 expression on the proliferation and the sensitivity to retinoic acid of breast cancer cells of different origin, *Usp. Mol. Oncol.*, **7**, 46-50, doi: 10.17650/2313-805X-2020-7-4-46-50.
 32. 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.
 33. Chen, A. C., Yu, K., Lane, M. A., and Gudas, L. J. (2003) Homozygous deletion of the CRABP1 gene in AB1 embryonic stem cells results in increased CRABP2 gene expression and decreased intracellular retinoic acid concentration, *Arch. Biochem. Biophys.*, **411**, 159-173, doi: 10.1016/S0003-9861(02)00732-4.
 34. Vaessen, M. J., Meijers, J. H. C., Bootsma, D., and Van Kessel, G. (1990) The cellular retinoic-acid-binding protein is expressed in tissues associated with retinoic-acid-induced malformations, *Development*, **110**, 371-378, doi: 10.1242/dev.110.2.371.
 35. Perez-Castro, A. V., Tran, V. T., and Nguyen-Huu, M. C. (1993) Defective lens fiber differentiation and pancreatic tumorigenesis caused by ectopic expression of the cellular retinoic acid-binding protein I, *Development*, **119**, 363-375, doi: 10.1242/dev.119.2.363.
 36. Pavone, M. E., Reierstad, S., Sun, H., Milad, M., Bulun, S. E., and Cheng, Y. H. (2010) Altered retinoid uptake and action contributes to cell survival in endometriosis, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **95**, E300-E309, doi: 10.1210/jc.2010-0459.
 37. Zhang, W., Levi, L., Banerjee, P., Jain, M., and Noy, N. (2015) Kruppel-like factor 2 suppresses

- mammary carcinoma growth by regulating retinoic acid signaling, *Oncotarget*, **6**, 35830-35842, doi: 10.18632/oncotarget.5767.
38. Tchekina, 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.
 39. Еникеев А. Д., Комельков А. В., Беляева А. А., Галецкий С. А., Чевкина Е. М. (2023) Экспрессия белка CRABP1 связана с уровнем резистентности к ретиноевой кислоте клеток злокачественных опухолей различного происхождения, *Рецепторы Внутриклет. Сигнал.*, **2**, 668-675.
 40. Budyak, I. L., Krishnan, B., Marcelino-Cruz, A. M., Ferrolino, M. C., Zhuravleva, A., and Gierasch, L. M. (2013) Early folding events protect aggregation-prone regions of a β -rich protein, *Structure*, **21**, 476-485, doi: 10.1016/j.str.2013.01.013.
 41. Ferrolino, M. C., Zhuravleva, A., Budyak, I. L., Krishnan, B., and Gierasch, L. M. (2013) Delicate balance between functionally required flexibility and aggregation risk in a β -rich protein, *Biochemistry*, **52**, 8843-8854, doi: 10.1021/bi4013462.
 42. Ignatova, Z., and Gierasch, L. M. (2004) Monitoring protein stability and aggregation *in vivo* by real-time fluorescent labeling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 523-528, doi: 10.1073/pnas.0304533101.
 43. Thakur, A. K., Meng, W., and Gierasch, L. M. (2018) Local and non-local topological information in the denatured state ensemble of a β -barrel protein, *Protein Sci.*, **27**, 2062-2072, doi: 10.1002/pro.3516.
 44. Donato, L. J., Suh, J. H., and Noy, N. (2007) Suppression of mammary carcinoma cell growth by retinoic acid: the cell cycle control gene Btg2 is a direct target for retinoic acid receptor signaling, *Cancer Res.*, **67**, 609-615, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0989.
 45. 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.
 46. Делекторская В. В., Чемерис Г. Ю., Каинов Я. А., Козлов Н. А., Зборовская И. Б. (2013) Экспрессия белка, связывающего ретиноевую кислоту, и пролиферативная активность клеток в нейроэндокринных опухолях поджелудочной железы, *Мол. Мед.*, **2013**, 38-43.
 47. Строганова А. М., Чемерис Г. Ю., Чевкина Е. М., Сендерович А. И., Карселадзе А. И. (2016) Белок CRABP1 и его роль в процессе дифференцировки нейробластомы, *Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина МЗ РФ*, **27**, 157-164.
 48. Celestino, R., Nome, T., Pestana, A., Hoff, A. M., Gonçalves, A. P., Pereira, L., Cavadas, B., Eloy, C., Bjørø, T., Sobrinho-Simões, M., Skotheim, R. I., and Soares, P. (2018) CRABP1, C1QL1 and LCN2 are biomarkers of differentiated thyroid carcinoma, and predict extrathyroidal extension, *BMC Cancer*, **18**, 68, doi: 10.1186/s12885-017-3948-3.
 49. Ahlquist, T., Lind, G. E., Costa, V. L., Meling, G. I., Vatn, M., Hoff, G. S., Rognum, T. O., Skotheim, R. I., Thiis-Evensen, E., and Lothe, R. A. (2008) Gene methylation profiles of normal mucosa, and benign and malignant colorectal tumors identify early onset markers, *Mol. Cancer*, **7**, 94, doi: 10.1186/1476-4598-7-94.
 50. Noy, N., Morgan, E., and Kannan-Thulasiraman, P. (2010) Involvement of fatty acid binding protein 5 and PPAR β/δ in prostate cancer cell growth, *PPAR Res.*, **2010**, 234629, doi: 10.1155/2010/234629.
 51. Levi, L., Lobo, G., Doud, M. K., Von Lintig, J., Seachrist, D., Tochtrop, G. P., and Noy, N. (2013) Genetic ablation of the fatty acid-binding protein FABP5 suppresses HER2-induced mammary tumorigenesis, *Cancer Res.*, **73**, 4770-4780, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0384.
 52. Еникеев, А. Д., Комельков, А. В., Елкина, Н. В., Аксельрод, М. Е., Козмичев, С. А., и Чевкина, Е. М. (2022) 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, *Usp. Mol. Oncol.*, **9**, 66-78, doi: 10.17650/2313-805X-2022-9-2-66-78.

OPPOSING EFFECTS OF CRABP1 AND CRABP2 HOMOLOGS ON THE PROLIFERATION OF BREAST CANCER CELLS AND THEIR SENSITIVITY TO RETINOIC ACID

A. D. Enikeev¹, P. M. Abramov¹, D. S. Elkin¹, A. V. Komelkov¹, A. A. Belyaeva¹,
D. M. Sylantjeva², and E. M. Tchekina^{1*}

¹ N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of Ministry of Health of Russian Federation,
115522 Moscow, Russia; e-mail: tchekina@mail.ru

² Pirogov Russian National Research Medical University, 117997 Moscow, Russia

Resistance of tumor cells to retinoic acid (RA), a promising therapeutic agent, is the major factor limiting the use of RA in clinical practice. The mechanisms of RA resistance are still poorly understood. Cellular Retinoic Acid Binding Proteins, CRABP1 and CRABP2, are essential mediators of RA signaling, but the role of the two CRABP homologs in regulating cellular sensitivity to RA has not been well studied. In addition, the effects of CRABP1 and CRABP2 on cell proliferation have not been compared. Here, using a broad panel of breast cancer cell lines with different levels of RA sensitivity/resistance, we show for the first time that in RA-sensitive cells, CRABP1 expression is restricted by methylation and protein levels are highly variable. In moderately RA-resistant lines, a high level of CRABP1 is observed both at the mRNA and protein levels, unchanged by inhibition of DNA methylation. The maximally resistant cell lines are characterized by complete repression of CRABP1 implemented at transcriptional and posttranscriptional levels, and exogenous expression of each of CRABP homologs has no effect on the studied characteristics. CRABP1 and CRABP2 proteins have opposing effects on proliferation and sensitivity to RA. Specifically, in initially RA-sensitive cells CRABP1 stimulates and CRABP2 reduces proliferation and resistance to RA, while in more resistant cells the role of each homolog in both of these indications is reversed. Overall, we have shown for the first time that CRABP proteins exert different effects on the growth and sensitivity to RA of breast cancer cells (stimulation, suppression, or no effect) depending on the baseline level of RA-sensitivity, with the effects of CRABP1 and CRABP2 homologs on the studied properties always being opposite.

Keywords: retinoic acid, ATRA, CRABP1, CRABP2, proliferation, RA-resistance, breast cancer