

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова

Биологический факультет

Кафедра вирусологии

Выпускная квалификационная работа бакалавра

студентки 4-го курса

**Кулаковой Екатерины Максимовны**

**Исследование неканонической («негеномной») активности ретиноевой  
кислоты в клетках злокачественных опухолей различного  
происхождения**

Работа выполнена в лаборатории регуляции  
клеточных и вирусных онкогенов НИИ  
канцерогенеза ФГБУ НМИЦ онкологии им.  
Н.Н.Блохина Минздрава РФ

Научные руководители:

зав. лаб., д.б.н., Чевкина Е.М.,

аспирант 1-го года обучения, Еникеев А.Д.

Куратор от кафедры:

профессор, д.б.н., Лазаревич Н.Л.

Москва

2019

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	3
ВВЕДЕНИЕ .....	5
ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ.....	7
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	8
1. Ретиноевая кислота .....	8
2. Транскрипционная активность ретиноевой кислоты. ....	12
3. Неканоническая активность ретиноевой кислоты .....	17
3.1 Функциональная активность протеинкиназы АКТ .....	17
3.2 Функциональная активность митоген-активируемой протеинкиназы ERK.....	19
3.3 Функциональная активность протеинкиназы p38 .....	21
3.4 РК-зависимая активация киназ АКТ, ERK и p38 .....	22
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	31
1. Клеточные линии и условия культивации .....	31
2. Стимуляция клеток полностью ретиноевой кислотой (АТРА).....	31
3. Выделение плазмидной ДНК .....	31
4. Трансформация компетентных клеток E. coli .....	32
5. Трансфекция.....	33
6. Инфекция псевдовиральными частицами.....	34
7. Приготовление клеточных лизатов .....	34
8. Вестерн-блот гибридизация .....	35
9. Денситометрический анализ .....	37
10. Растворы, реагенты и среды .....	38
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ .....	40

1. Сравнение эндогенного уровня экспрессии CRABP1 в клетках различного происхождения .....	40
2. Анализ РК-зависимой активации протеинкиназ АКТ и ERK1/2 в клеточной линии рака молочной железы MDA-MB-231 и глиобластомы LN229 .....	43
3. Анализ влияния подавления экспрессии CRABP1, и CRABP2 на активность протеинкиназы ERK1/2 в клетках РМЖ MCF7.....	50
4. Получение линий MDA-MB-231 с гиперэкспрессией CRABP1.....	52
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	54
ВЫВОДЫ.....	57
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	58

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

**PK** – ретиноевая кислота

**Akt** – альфа серин-треониновая киназа (RAC-alpha serine/threonine-protein kinase)

**ALDH** – альдегиддегидрогеназа (aldehyde dehydrogenase)

**Bad** – Bcl-2-ассоциированный промотор смерти (Bcl-2-associated death promoter)

**Bcl** – белок В-клеточной лимфомы (B-cell lymphoma)

**CDK** – циклинзависимая киназа (cyclin-dependent kinase, CDK)

**Cip/Kip** – белок, взаимодействующий с Cdk/белок, ингибирующий киназу (CDK interacting protein/kinase inhibitor protein)

**CRABP** – клеточный белок, связывающий PK (cellular retinoic acid binding protein)

**CREB** – белок, связывающий респонсивный элемент цАМФ (cAMP response element-binding protein)

**CYP** – цитохром P450 (cytochrome P450)

**ER** – рецептор эстрогена (estrogen receptor)

**ERK** – киназа, регулируемая экстраклеточными сигналами extracellular signal-regulated kinase

**FABP** – белок, связывающий жирные кислоты (fatty acid binding protein)

**FXR** – рецептор желчных кислот (farnesoid X receptor)

**GSK** – гликогенсинтазная киназа (Glycogen synthase kinase)

**HAT** – гистоновая ацетилтрансфераза (histone acetyltransferase)

**HSF** – склеральные фибробласты человека (Human Scleral Fibroblasts)

**iLBP** – семейство внутриклеточных белков, связывающих жирные кислоты (intracellular lipid-binding protein family)

**LXR** – X рецептор печени (liver X receptor)

**МАРК** – киназа, активируемая митогенами (mitogen-activated protein kinase)

**MSK** – киназа, активируемая митогенами и стрессом (mitogen- and stress-activated kinase)

**PDK** – фосфоинозитид-зависимая киназа (Phosphoinositide-dependent kinase)

**PI3K** – фосфатидилинозитол-3-киназа (Phosphoinositide 3-kinase)

**PPAR** – рецептор, активируемый пролифераторами пероксисом (peroxisome proliferator-activated receptors)

**RAR** – рецептор ретиноевой кислоты (retinoic acid receptor)

**RARE** – респонсивный элемент ретиноевой кислоты (retinoic acid responsive element)

**RBP** – белок, связывающий ретинол (retinol binding protein)

**RDH** – ретинол-дегидрогеназа (retinol dehydrogenase)

**REN** – ретинил-эфир-гидролаза (retinyl ester hydrolase)

**RXR** – рецептор неустановленного ретиноида (retinoid X receptor)

**SRC** – коактиватор андрогенового рецептора (steroid receptor coactivator-1)

**STRA** – рецептор витамина А (stimulated by retinoic acid)

**TR** – рецептор тиреоидного гормона (thyroid hormone receptor)

**UDP** – уридиндифосфат (Uridine diphosphate)

**UGT2B7** – UDP-глюкуронозилтрансфераза (UDP-Glucuronosyltransferase-2B7)

**VDR** – рецептор витамина Д (vitamin D receptor)

## **ВВЕДЕНИЕ**

Ретиноевая кислота (РК) является важнейшим внутриклеточным метаболитом ретинола, задействованным в регуляции ключевых процессов в клетке и в организме в целом. Основная функция РК связана с процессами дифференцировки и осуществляется с помощью регуляции экспрессии большого числа ретиноид-респонсивных генов. Эта каноническая (транскрипционная или геномная) активность РК реализуется с помощью РК-зависимой активации ядерных рецепторов РК, прежде всего RAR и RXR, которые являются лиганд-зависимыми транскрипционными факторами.

В связи про-дифференцировочной и антипролиферативной активностью РК, в настоящее время предпринимаются активные попытки использования РК в клинической практике, однако терапевтическое использование РК сильно ограничено быстрым формированием РК-резистентности.

Доставка РК к рецепторам и внутриклеточная «судьба» РК в целом во многом определяется белками, связывающими РК, прежде всего CRABP1 и CRABP2 (Cellular Retinoic Acid Binding Protein<sup>1,2</sup>). При этом если для CRABP2 именно эта функция (связывание и доставка РК к ядерным рецепторам) считается основной и хорошо охарактеризована, то роль CRABP1 на сегодняшний день остается мало понятной. Одной из предполагаемых функций данного белка, обладающего наибольшей аффинностью к РК среди всех РК-связывающих белков, является негативная регуляция активности РК за счет ее секвестрирования в цитоплазме. Еще менее понятна и почти не изучена роль белков CRABP в проведении недавно показанной негеномной активности РК, заключающейся в кратковременной нетранскрипционной активации ряда белков, включая важнейшие

протеинкиназы ERK1/2, АКТ и р38. Механизмы этой «неканонической» активности РК, показанной на нескольких типах клеток, а также кинетика и мишени, активируемые РК, пока изучены мало, и данные очень противоречивы, хотя предполагается, что эта активность может быть связана с формированием РК-резистентности.

В двух работах одной группы авторов выявлено участие белка CRABP1 в RAR-независимой активации ERK1/2 под действием полностью транс-ретиноевой кислоты (all-trans-retinoic acid, ATRA) в эмбриональных стволовых клетках. Более того, авторы показали, что CRABP1 не влияет на транскрипционную РК-зависимую активацию ERK1/2, но необходим для реализации краткосрочной активации данной киназы. В этом отношении важно отметить, что по данным, полученным сотрудниками лаборатории, в клетках, где отсутствует эндогенная экспрессия белка CRABP1 (например, линия A549 аденокарциномы легкого), эффект РК-зависимой краткосрочной активации как ERK1/2, так и АКТ имеет место и хорошо выражен. Этот же эффект для клеток A549 показан и другими авторами. Таким образом, представляется очень важным исследовать, насколько универсальным является эффект РК-зависимой краткосрочной активации указанных выше протеинкиназ, какова динамика этих процессов в разных клетках, и как влияет белок CRABP1 на неканоническую активность РК. Также важно понять, влияет ли данный белок на активность протеинкиназ, таких как ERK1/2, без дополнительной стимуляции РК.

## **ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ**

**Цель работы:** исследование неканонической активности РК в отношении отдельных протеинкиназ в клеточных линиях различного происхождения (рака молочной железы MDA-MB-231 и глиобластомы LN229) при отсутствии эндогенной экспрессии CRABP1, а также получение производной линии MDA-MB-231 с экзогенной экспрессией CRABP1.

В соответствии с целью работы были поставлены следующие **экспериментальные задачи:**

1. Сравнить уровень продукции белка CRABP1 в трансформированных клетках различного происхождения и выбрать линии клеток с отсутствием эндогенной экспрессии CRABP1.
2. Исследовать влияние РК при различных сроках инкубации с ATRA на уровень активирующего фосфорилирования протеинкиназ АКТ и ERK1/2 в клетках рака молочной железы.
3. Исследовать влияние РК при различных сроках инкубации с ATRA на уровень активирующего фосфорилирования протеинкиназ АКТ, ERK1/2 и p38 в клетках глиобластомы.
4. Определить влияние нокдауна CRABP1 и CRABP2 на статус фосфорилирования ERK1/2 в клетках молочной железы при наличии эндогенной экспрессии.
5. Получить сублинию клеток рака молочной железы с гиперэкспрессией CRABP1.

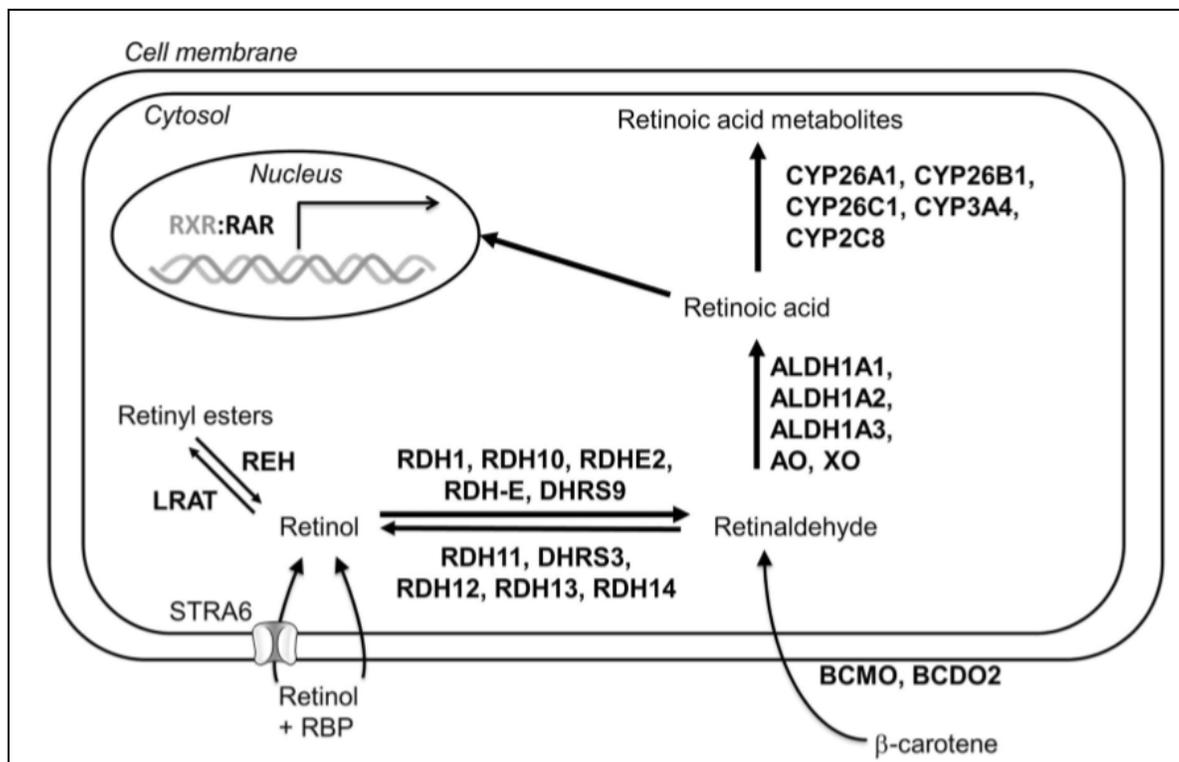
## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1. Ретиноевая кислота

Ретиноевая кислота (РК) – это метаболит витамина А (ретинола), играющий важную роль в самых различных биологических процессах. РК участвует в эмбриогенезе, дифференцировке клеток, а также регуляции пролиферации и апоптоза. Показано, что РК играет роль в формировании передне-задней оси тела, конечностей (Eichele, 1989), развитии легких, центральной нервной системы и в процессах гемопоэза (Collins, 2002). Кроме того, РК принимает участие в формировании иммунного ответа и способна регулировать широкий спектр иммунных реакций организма. В частности, РК стимулирует дифференцировку В-клеток в плазмоциты, повышая титр антител, усиливает тканеспецифичный хоуминг В- и Т-лимфоцитов (Iwata, Hirakayama и др., 2004) и способствует дифференцировке предшественников миелоцитов в нейтрофилы (Gupta, Shah и др., 2014).

Молекула РК состоит из объемной гидрофобной области, концевой полярной карбоксильной группы и линкера между ними. В организме ретиноиды накапливаются в звездчатых клетках печени и жировой ткани в форме неактивных эфиров, в частности, ретинолового эфира пальмитиновой кислоты (Sauvant, Cansell и др., 2011). При необходимости эфиры при участии ретинил-эфир-гидролазы (REN) гидролизуются до ретинола, который является основной транспортируемой формой ретиноидов. Далее ретинол, связанный с плазматическим ретинол-связывающим белком (RBP4), разносится кровотоком по организму и проникает в клетки с помощью транспортера STRA6, а также благодаря своей гидрофобной природе распространяется пассивной диффузией через мембрану. В клетке он обратимо окисляется до ретинальдегида с помощью алкогольдегидрогеназ

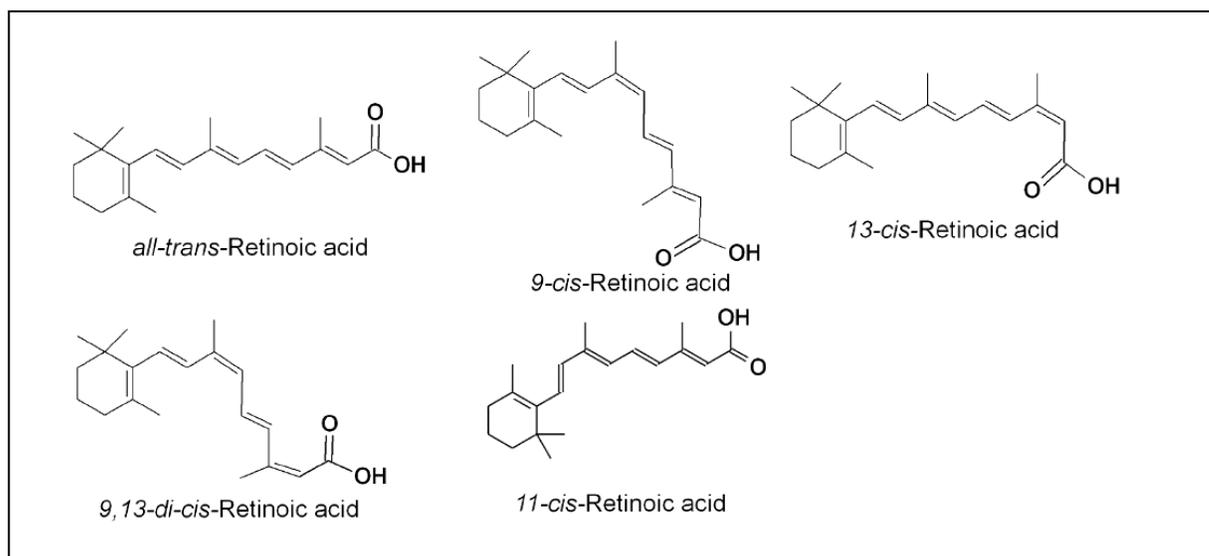
RDH10, RDH-E, RDHE2, DHRS9. Кроме того, ретинальдегид может образовываться при расщеплении  $\beta$ -каротина. Наконец, альдегиддегидрогеназы ALDH1A1, ALDH1A2, ALDH1A3 необратимо окисляют ретинальдегид до ретиноевой кислоты (Kedishvili, 2013) (Рисунок 1).



**Рисунок 1.** Метаболизм ретиноевой кислоты. Адаптировано из (Stevison, Jing и др., 2015)

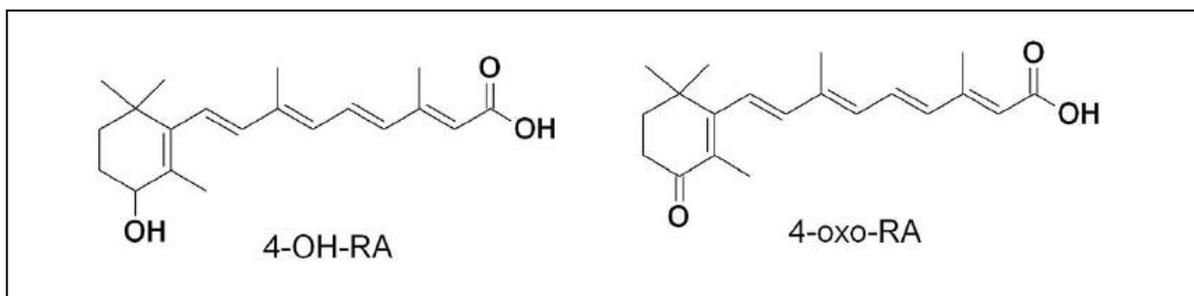
В клетке РК существует в виде пяти изомеров: полностью транс-ретиноевой кислоты (**All-Trans-Retinoic Acid**, ATRA), 9-цис-ПК, 11-цис-ПК, 13-цис-ПК и 9,13-цис-ПК (Рисунок 2). Содержание 9-цис-ПК *in vivo* обычно невысоко и достигает существенных концентраций лишь в некоторых тканях, например, в поджелудочной железе (Kane, Folias и др., 2010), 13-цис-ПК присутствует в значительном количестве во всех тканях, но обладает низкой

аффинностью к рецепторам РК (Åström, Pettersson и др., 1990), а 9,13-цис-РК, по-видимому, лишена биологической активности (Chen, Sass и др., 2000). Чаще всего при окислении ретинальдегида образуется полностью транс-ретиновая кислота, АТРА (**All-Trans-Retinoic Acid**), она же обладает наибольшей биологической активностью, поэтому именно этот изомер обычно используют в исследованиях.



**Рисунок 2.** *Изомеры ретиновой кислоты*

Концентрация РК в клетках строго контролируется как на уровне синтеза, так и на уровне распада. Удаление избытков РК в клетке осуществляется посредством ее катаболизма ферментами системы цитохромов, что приводит к образованию менее активных полярных метаболитов. Считается, что преобладающим путем элиминации АТРА является ее окисление в 4 положении  $\beta$ -кольца с образованием 4-ОН-РА. В свою очередь 4-ОН-РА преобразуется глюкуронтрансферазой UGT2B7 в ретинил- $\beta$ -глюкоронид или окисляется до 4-охо-РА белками семейства CYP26 (Stevison, Jing и др., 2015) (Рисунок 3).



**Рисунок 3.** *Метаболиты ретиноевой кислоты*

Важно отметить, что гены, кодирующие наиболее специфичные в отношении РК цитохромы (прежде всего CYP26A1 и CYP26A2), сами относятся к ретиноид-респонсивным генам, то есть регулируются РК, создавая таким образом регуляторную петлю, необходимую для поддержания внутриклеточного уровня РК (Ray, Vain и др., 1997).

В связи с про-дифференцировочной активностью, в канцерогенезе РК играет преимущественно роль опухолевого супрессора. Для многих типов опухолей показано, что РК стимулирует дифференцировку, снижает способность к неприкрепленному росту и пролиферационную активность опухолевых клеток, активирует апоптоз и подавляет ангиогенез (Hsu, Hsu и др., 2000). Кроме того, показано РК-зависимое снижение образования колоний клетками меланомы (Meyskens, Salmon, 1979), подавление роста и апоптоз клеток гепатоцеллюлярной карциномы Hep3B (Hsu, Wu и др., 1998), а также снижение уровня пролиферации и уменьшение инвазивной способности клеток рака молочной железы MDA-MB-231 (Dutta, Sen и др., 2010). Для ряда клеток (линии промиелоцитарного лейкоза (HL-60), меланомы (B-16), эмбриональной тератокарциномы (F9), рака молочной железы MCF7/C6 и др.) показана способность РК стимулировать дифференцировку (Yan, Li и др., 2016).

В настоящее время предпринимаются попытки использования РК и ее аналогов для терапии различных онкологических заболеваний. Наиболее успешно РК применяется в клинической практике для терапии острого промиелоцитарного лейкоза (Dvorak, Sanders и др., 2007). Однако до сих пор применение РК сильно ограничено, прежде всего, за счет быстрого приобретения устойчивости малигнизированными клетками, а также вследствие большого количества побочных эффектов (Freemantle, Spinella и др., 2003).

Кроме того, в отдельных типах тканей активность РК приводит к обратному эффекту, способствуя выживанию и пролиферации опухолевых клеток. Прежде всего это относится к нейронам (Henion, Weston, 1994). Сходное действие РК оказывает на клетки эпителия, например, способствует пролиферации кератиноцитов и заживлению ран (Kang, Duell и др., 1995). Есть и единичные свидетельства такой активности РК и для клеток другого происхождения. Так, в клетках немелкоклеточного рака легких A549 РК стимулирует выживание и усиление миграции (Quintero Barceinas, Garcia-Regalado и др., 2015). Одно из возможных объяснений таких противоречивых эффектов РК в настоящее время связывают с тканеспецифичной активацией различных ядерных рецепторов в клетках (Schug, Berry и др., 2007).

## **2. Транскрипционная активность ретиноевой кислоты.**

Функциональная активность РК в клетке реализуется посредством специфичных ядерных рецепторов, являющихся транскрипционными факторами. С помощью этих белков РК может регулировать экспрессию более 500 генов-мишеней. К таким мишеням помимо генов, регулирующих активность самой РК, стероидных гормонов и их рецепторов, относится и ряд

генов, известных своим участием в опухолевой прогрессии, например, р53-зависимый регулятор клеточного цикла Btg2 (Donato, Suh и др., 2007), гены каспазы 7 и каспазы 9 (Donato, Noy, 2005). Также показано РК-зависимое уменьшение экспрессии некоторых ингибиторов апоптоза, например, сурвивина и Bcl-2 (Raffo, Emionite и др., 2000). Имеются данные об РК-зависимом усилении экспрессии фактора транскрипции SOX9 и опухолевого супрессора PDCD4 (Afonja, Raaka и др., 2002).

Рецепторы РК, осуществляющие ее транскрипционную активность, относятся к семейству стероидных и тиреоидных гормонов и являются лиганд-зависимыми транскрипционными факторами. Существует 2 основных класса рецепторов РК: RAR (**R**etinoic **A**cid **R**eceptor) и RXR (**R**etinoid-**X**-**R**eceptor). В состав каждого класса входят 3 подтипа:  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ , кодируемые различными генами. Наибольшей аффинностью связывания с РК обладает RAR $\alpha$ , который играет, по-видимому, основную роль в передаче сигнала от РК.

С белками RAR связываются транс-ПК и 9-цис-ПК, с RXR – только 9-цис-ПК. Но так как транс-ПК способна превращаться в 9-цис-ПК, высокие концентрации транс-ПК также активируют RXR (Heyman, Mangelsdorf и др., 1992).

Белки RXR могут активировать транскрипцию в виде гомодимера, в то время как активация транскрипции белками RAR обычно осуществляется в составе гетеродимера с RXR. Это взаимодействие необходимо для того, чтобы белковые комплексы связывались с чувствительными к РК элементами RARE (**R**etinoic **A**cid **R**esponsive **E**lements), расположенными в промоторах их генов-мишеней. Последовательность RARE состоит из 2 гексамерных

повторов [A/G]G[G/T]TCA, разделенных пятью (DR5), двумя (DR2) или одним (DR1) нуклеотидом.

Связывание гетеродимера RXR/RAR с РК вызывает изменение конформации лиганд-связывающего домена гетеродимера, что, в свою очередь, приводит к высвобождению из комплекса корепрессоров и связыванию коактиваторов транскрипции, таких как белки SRC-1, -2, -3, а также гистоновых ацетилтрансфераз (НАТ) или гистоновых аргининметилтрансфераз. Это приводит к модификации гистонов, привлечению РНК-полимеразы II и активации транскрипции (Dilworth, Chambon, 2001).

Среди генов, регулируемых РК, существуют как истинно РК-респонсивные гены, которые содержат RARE-последовательность в своем промоторе и всегда отвечают на РК повышением экспрессии, так и такие, которые не имеют в своем составе RARE, их экспрессия может усиливаться или подавляться в ответ на добавление РК за счет регуляции, опосредованной продуктами генов первой группы.

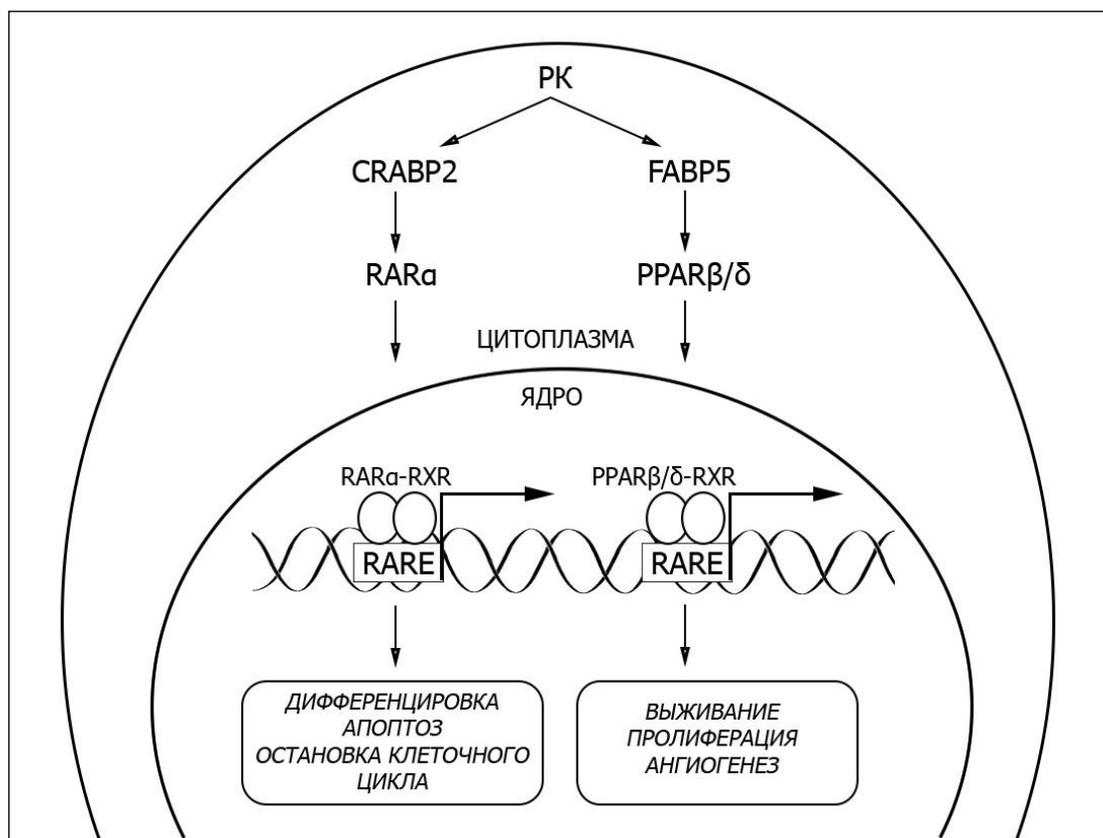
RXR может образовывать гетеродимеры и с рядом других ядерных рецепторов, включая эстрогеновый рецептор ER $\alpha$ , рецептор тиреоидного гормона (TR), AP-1 рецептор, рецептор витамина D (VDR), рецептор желчных кислот (FXR), X рецепторы печени (LXR $s$ ).

Помимо белков RAR и RXR, РК могут связывать и другие ядерные рецепторы. Показано, что РК является лигандом для рецептора PPAR $\beta/\delta$ , функционирующего, подобно RAR, в гетеродимере с RXR (Shaw, Elholm и др., 2003). Считается, что рецепторы RAR опосредуют активацию генов, продукты которых стимулируют дифференцировку, апоптоз или вызывают остановку клеточного цикла, в то время как PPAR $\beta/\delta$  активирует экспрессию

генов, которые способствуют выживанию, росту и пролиферации, а также стимулируют ангиогенез. Поскольку в большинстве тканей соотношение уровней данных рецепторов сдвинуто в сторону RAR, РК чаще реализует опухоль-супрессорную функцию (Schug, Berry и др., 2007).

Внутриклеточный транспорт и доставку РК к рецепторам осуществляют белки, принадлежащие к большому семейству внутриклеточных липид-связывающих белков (iLBP, intracellular Lipid Binding Proteins). К этому семейству относят белки, связывающие ретиноевую кислоту, CRABP1 и CRABP2 (Retinoic Acid Binding Proteins 1 и 2), а также белки из группы FABP (fatty acid binding proteins), которые связывают различные жирные кислоты и их производные. Белки iLBP представляют собой ядерно-цитоплазматические «шаттлы». В отсутствие лигандов они локализуются в цитоплазме, взаимодействие с лигандами приводит к открытию или формированию сигнала ядерной локализации. Это создает возможность взаимодействия с  $\alpha$ -импортинами, и белки iLBP перемещаются в ядро, где связываются с соответствующим рецептором и передают РК. Соответственно, взаимодействие РК с белками iLBP не только предохраняет ее от гидрофильной среды, но и опосредуют ее внутриклеточные функции, доставляя РК к соответствующим рецепторам и стимулируя их транскрипционную активность (Dong, Ruuska и др., 1999). Три белка суперсемейства iLBPs: CRABP2, FABP5 и FABP4 - избирательно взаимодействуют с ядерными рецепторами RAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  и PPAR $\gamma$  соответственно и селективно проводят сигнал от РК к регулируемым ими генам. При этом комплекс CRABP2/RAR обладает наибольшей аффинностью, а FABP4/PPAR $\gamma$  – наименьшей, поэтому в подавляющем большинстве клеток преобладает проведение РК-зависимого сигнала через

CRABP2-RAR. Известно, что FABP5 помимо РК может связывать и другие лиганды, однако только взаимодействие с РК приводит к его ядерной транслокации и дальнейшему связыванию с рецептором PPAR $\beta/\delta$ . CRABP1, в отличие от CRABP2, не образует комплекса с RAR, и его функции, как в отношении ретиноевого сигналинга, так и в процессах жизнедеятельности в клетке в целом, остаются малопонятными. Предполагается, что его основной функцией может быть предохранение клетки от избытка РК путем ее секвестрирования в цитоплазме.



*Рисунок 4. Транскрипционная активность ретиноевой кислоты*

### 3. Неканоническая активность ретиноевой кислоты

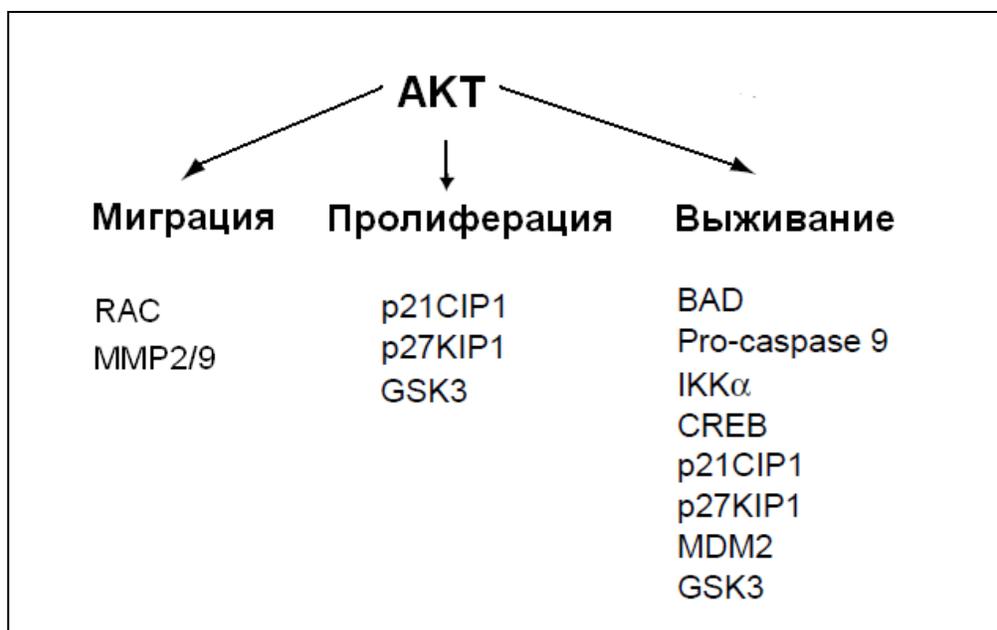
Ретиноевая кислота также может напрямую регулировать активацию некоторых сигнальных путей с помощью так называемых негеномных механизмов. Так называемая неканоническая активность РК заключается в нетранскрипционной активации в цитоплазме клеток некоторых белков, включая важнейшие регуляторные протеинкиназы АКТ, ERK1/2 и p38МАРК. Ниже мы приведем основные сведения о функциях этих белков в клетке.

#### 3.1 Функциональная активность протеинкиназы АКТ

АКТ – внутриклеточный фермент из семейства протеинкиназ В. Киназа АКТ является ключевым ферментом сигнального пути PI3K/АКТ и вовлечена в регуляцию пролиферации, роста и выживания клеток (Chen, Xu и др., 2001). Большую часть времени АКТ находится в клетке в неактивном состоянии, для его активации необходима работа киназы PI3K, представляющей собой гетеродимер, состоящий из регуляторной (p85) и каталитической (p110) субъединиц. В ответ на взаимодействие лиганда с тирозинкиназным рецептором происходит связывание SH2-домена рецептора с p85. Эта ассоциация способствует активации каталитической субъединицы p110, которая фосфорилирует фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат (PI(4,5)P<sub>2</sub>), локализованный на внутренней стороне плазматической мембраны, до фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфата (PI(3,4,5)P<sub>3</sub>). Обратный процесс осуществляет фосфатаза PTEN. К PI(3,4,5)P<sub>3</sub> на мембране привлекается киназа АКТ, где она фосфорилируется ферментами PDK1/2 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1), после чего покидает мембрану и перемещается в цитоплазму и ядро клетки, где фосфорилирует мишени,

которые обеспечивают дальнейший клеточный ответ (Hemmings, Restuccia, 2012). К таким мишеням относятся регуляторы пролиферации, например, АКТ подавляет работу ингибиторов циклинзависимых киназ из семейства CIP/KIP (p21<sup>CIP1</sup>, p27<sup>KIP1</sup>), инактивирует GSK-3 $\beta$  (Glycogen synthase kinase 3 beta), способствуя деградации  $\beta$ -катенина, что ведет к фосфорилированию циклинов D, C и повышенной экспрессии онкогена Мус, что приводит в итоге к стимуляции деления клеток (McCubrey, Steelman и др., 2014). Также показано, что АКТ-сигнальный путь подавляет про-апоптотические белки Bad, каспазы-3, 9, активирует способствующую выживанию убиквитинлигазу Mdm2 (вызывает деградацию p53) (Mayo, Donner, 2001) и транскрипционные факторы FOXO, NF- $\kappa$ B (Song, Ouyang и др., 2005). Кроме того, посредством активации фактора транскрипции CREB АКТ увеличивает экспрессию анти-апоптотических белков Bcl-2, Mcl-1 (Du, Montminy, 1998).

Также имеются многочисленные данные о том, что АКТ оказывает влияние на рост клеток путем активации киназы mTOR, вовлеченной в регуляцию инициации трансляции и биогенез рибосом (Manning, Cantley, 2007), а также стимулирует подвижность клеток и ангиогенез (Chen, Somanath и др., 2005). На рисунке 5 приведены основные мишени АКТ, задействованные в про-канцерогенной активности данной киназы.



*Рисунок 5. Функциональная активность протеинкиназы АКТ*

### **3.2 Функциональная активность митоген-активируемой протеинкиназы ERK**

Другая важная мишень неканонической активности АТРА – митоген-активируемая киназа ERK, представленная в клетке двумя близкими по структуре белками, ERK1 и ERK2. Эти белки являются компонентами MAPK/ERK сигнального пути, который принимает участие в активации пролиферации, клеточного роста и ангиогенеза. Сигнальный путь ERK запускается в ответ на сигналы, полученные рецепторами клетки (прежде всего рецепторами ростовых факторов), это ведет за собой активацию малой ГТФазы Ras, которая, в свою очередь, активирует фосфорилирующую активность RAF-киназы (MAPKKK). RAF связывает и активирует киназу MEK (MAPKK), представленную двумя компонентами MEK1 и MEK2, а MEK1/2 активирует ERK1/2 (MAPK). Фосфорилирование

ERK1/2 происходит вблизи клеточной мембраны, после этого фермент перемещается в цитоплазму, где фосфорилирует и регулирует активность целого ряда белков, а затем поступает в ядро, где участвует в регуляции транскрипции. Всего для ERK в клетке насчитывается более 80 мишеней (Orton, Sturm и др., 2005).

ERK1/2 индуцирует транскрипцию генов, обеспечивающих вход в клеточный цикл, и подавляет негативные регуляторы пролиферации (Chambard, Lefloch и др., 2007). К мишеням ERK относятся транскрипционные факторы Ets, Elk-1, SAP-1, регулирующие экспрессию ключевых генов, вовлеченных в процессы прохождения клеточного цикла и роста клеток. Показано, что ингибиторы MAPK/ERK-пути способствуют остановке клеточного цикла, уменьшая экспрессию циклина E, циклина D1 и прокаспазы 3. Однако в клетках злокачественных опухолей «вышестоящие» в цепи передачи сигналов белки RAS и RAF, как и рецепторы факторов роста, часто мутированы, что снижает чувствительность клеток к ингибиторам (Santarpia, Lippman и др., 2012).

Среди генов, индуцированных MAPK/ERK путем, особенно значимыми в контексте канцерогенеза являются гены, кодирующие факторы транскрипции Fos и Jun. После синтеза эти два белка могут связываться друг с другом с образованием гетеродимера AP-1, фактора транскрипции широкого действия, который часто обнаруживается в гиперактивной форме в раковых клетках (Curran, 1992).

Однако киназа ERK способна осуществлять и противоопухолевую активность. Известно, что ERK участвует в апоптозе, увеличивая экспрессию лигандов смерти TNF $\alpha$  и FasL или рецепторов смерти Fas, DR4, DR5 (Drosopoulos, Roberts и др., 2005). ERK индуцирует активацию каспазы-8,

про-апоптотических белков Bax, Puma, Bak (Liu, Mao и др., 2008) и подавляет анти-апоптотический белок Bcl-2 (Cagnol, Chambard, 2010).

Кроме того, показано, что MAPK/ERK сигнальный каскад повышает стабильность опухолевого супрессора p53, фосфорилируя его по серину в 15 положении (Persons, Yazlovitskaya и др., 2000) и инактивируя Mdm2, убиквитин-лигазу, способствующую деградации p53, при фосфорилировании его по серину в 166 положении (Courtois-Cox, Genter Williams и др., 2006). Кроме того, в клетках феохромоцитомы мыши PC12 ERK2 непосредственно фосфорилирует ядерный рецептор РК RAR $\beta$ 2, который считается опухолевым супрессором (Piu, Gauthier и др., 2006).

Таким образом, АКТ является преимущественно онкогеном с широким спектром действия, стимулирующим выживание и миграцию клеток, в то время как ERK проявляет как онкогенные, так и опухоль-супрессорные свойства.

### **3.3 Функциональная активность протеинкиназы p38**

Еще одним белком, активацию которого связывают с нетранскрипционной активностью РК, является MAP-киназа p38, которая принимает участие в дифференцировке клеток, апоптозе и аутофагии.

Сигнальный путь MAPK/p38 активируется в ответ на широкий спектр внеклеточных стрессовых стимулов, таких как провоспалительные цитокины (TNF- $\alpha$  и IL-1), ультрафиолетовое излучение, тепло и осмотический шок. Стресс-сигнал передается белкам семейства ГТФазы Rho, которые, в свою очередь, с помощью киназ MEK1/4, MLK2/3, ASK1/2 (MAPKKK) активируют киназы MKK3/6 (MAPKK), проявляющие фосфорилирующую

активность по отношению к p38. Существует также MAPKK-независимый механизм активации MAPK p38 с участием TAB1 (TGF- $\beta$  activated kinase 1 - binding protein 1). В этом случае активация p38 достигается аутофосфорилированием p38 в результате взаимодействия с TAB1 (Ge, Gram и др., 2002).

Описана активность киназы как в ядре, так и в цитоплазме. Было показано, что p38 фосфорилирует и активирует киназу MAPKAPK-2, участвующую во многих клеточных процессах, включая стрессовые и воспалительные реакции, ядерный экспорт, регуляцию экспрессии генов и пролиферацию клеток (Engel, Kotlyarov и др., 1998). Также p38 активирует транскрипционные факторы, такие как ATF1/2/6, (для ATF2, в частности, показана активация в опухолях кожи (Papassava, Gorgoulis и др., 2004)), участвующий в дифференцировке (Zhao, New и др., 1999), p53, cJUN (замедляет рост), MITF1, DDIT3, ELK1, HBP1, а также вспомогательный белок транскрипционного фактора SRF (Serum Response Factor) Кроме того, p38 косвенно регулирует активность важного фактора транскрипции AP-1. Механизм этой регуляции включает связывание вышеупомянутого ATF2 с Jun и воздействие белка Sap-1a, являющегося мишенью фосфорилирования p38, на экспрессию c-Fos. (Janknecht, Hunter, 1997; Zarubin, Han, 2005)

### **3.4 РК-зависимая активация киназ АКТ, ERK и p38**

Недавно было обнаружено, что киназы АКТ и ERK могут активироваться в ответ на стимуляцию ретиноевой кислотой. В нескольких работах было показано быстрое (в течение 5-15 минут) фосфорилирование данных киназ, не связанное с транскрипционной активностью рецепторов RAR. Такой эффект зарегистрирован для клеток немелкоклеточного рака

легких A549 в двух работах одной группы авторов. Кратковременная инкубация клеток с АТРА приводила к перемещению рецептора RAR $\alpha$  к плазматической мембране, активации АКТ и последующему усилению инвазивности клеток за счет активации малой ГТФазы Ras, стимулирующей формирование протрузий посредством полимеризации актина и увеличения экспрессии металлопротеазы MMP-9. Кроме того, было показано, что АКТ нарушает АТРА-индуцированную экспрессию опухолевых супрессоров p53 и RAR $\beta$ 2 (García-Regalado, Vargas и др., 2013). В отличие от АКТ, АТРА-зависимая активация ERK в той же клеточной линии происходит, по-видимому, независимо от RAR, при этом ингибирование PI3K, наоборот, повышает активацию ERK (Quintero Barceinas, Garcia-Regalado и др., 2015).

В работах другого коллектива сходное явление наблюдалось в клетках нейробластомы SH-SY-5Y, где кратковременная инкубация с АТРА посредством активации PI3K/АКТ-зависимого сигнального пути индуцировала дифференцировку. Обработка клеток АТРА приводила к быстрому фосфорилированию киназы АКТ по остатку Ser-473, которая, в свою очередь, подавляла ингибирующие дифференцировку транскрипционные факторы ID1-3, препятствующие связыванию других транскрипционных факторов bHLH (basic Helix-Loop-Helix) с E-box-участками их генов-мишеней. Также АТРА увеличивала уровень мРНК нейрон-специфичного гена GAP43 (Growth Associated Protein 43), используемого в качестве маркера дифференцировки, и анти-апоптотического белка Bcl-2 (Lopez-Carballo, Moreno и др., 2002).

Наконец, в работах третьей группы исследователей эффект краткосрочной нетранскрипционной активности РК выявлен на эмбриональных стволовых клетках (ECS), причем на этой модели впервые

показано участие в процессе белка CRABP-1. Авторы работы выяснили, что белок CRABP-1 связанный с ретиноевой кислотой с помощью RAR-независимого механизма способствует активации в цитоплазме ERK1/2, который затем мигрирует в ядро и, возможно посредством активации фосфатаз, дефосфорилирует по Ser-10 белок p27 – ингибитор циклинзависимых киназ из семейства CIP. Дефосфорилированный p27 не способен возвращаться в цитоплазму, где происходит его деградация, и накапливается в ядре, где ингибирует Cdk2 и не позволяет клетке перейти из фазы G1 в S. В таких клетках было зарегистрировано замедление пролиферации и повышение способности к дифференцировке. Кроме того, задержке клеток в G1 фазе способствовала ERK-индуцированная активация опухолевого супрессора фосфатазы PP2A (Persaud, Park и др., 2016).

В эмбриональных стволовых клетках авторы наблюдали две фазы ATRA-индуцированной активации ERK1/2: краткосрочную (проявляется в первые 30 минут после стимуляции) и долговременную (8-12 часов). Было выяснено, что краткосрочная активация нуждается в участии CRABP1 и происходит независимо от рецепторов RAR и мембранных тирозинкиназных рецепторов, («неканоническая» или нетранскрипционная активность), в то время как долговременная осуществляется через транскрипционную активность RAR (Persaud, Lin и др., 2013).

Все эти работы указывают на то, что действие РК сходно со стероидными гормонами, у которых есть аналогичные ядерные рецепторы, и может реализовываться по двум основным механизмам, оказывая долговременный эффект, возникающий после нескольких часов (по разным данным, от 3 до 12) и опосредуемый транскрипционной активностью рецепторов, а также кратковременное воздействие, не связанное с

транскрипционной активацией. Однако сходство описанного эффекта в указанных работах заключается лишь в демонстрации общего феномена неканонической активности РК в отношении клеточного сигналинга. В остальном данные перечисленных работ очень противоречивы как в отношении функционального значения для клетки (дифференцировка и апоптоз или наоборот, стимуляция пролиферации и выживания), так и в отношении молекулярных механизмов, опосредующих эту активацию.

Согласно одному из предложенных механизмов, АТРА способствует привлечению RAR к плазматической мембране и формированию сигнального комплекса с помощью RAR-зависимого механизма. В отсутствие АТРА RAR способен стабильно связываться с регуляторной субъединицей PI3K, а при взаимодействии с АТРА значительно повышается его сродство к каталитической субъединице, что приводит к сборке двух субъединиц в рабочий комплекс PI3K и активации PI3K-зависимого сигнального пути (Masiá, Varetino и др., 2007).

Как именно АТРА активирует ERK, до сих пор неизвестно. Имеются данные, свидетельствующие о том, что RAR $\alpha$  опосредует быстрое действие АТРА в нейронных клетках, поскольку он присутствует на мембранах, и активирует ERK посредством PI3K (Chen, Napoli, 2008).

Другое исследование показало, что в нейронных клетках в негеномном эффекте АТРА в отношении активации ERK участвует присутствующий в цитоплазме RAR $\gamma$  совместно с Src (Dey, De и др., 2007). Кроме того, в клетках феохромоцитомы мыши PC12 ERK2 непосредственно фосфорилирует опухолевый супрессор RAR  $\beta$ 2 (Piu, Gauthier и др., 2006).

Еще один механизм активации ERK может быть связан с липофильной природой ретиноевой кислоты. Ретиноиды связываются с регуляторным доменом c-Raf и PKC, модулируя их активность (Hoyos, Imam и др., 2002).

Интересно, что для A549 использованием химических ингибиторов показана негативная регуляция ERK сигнальным путем PI3K/AKT. Так, ATRA-зависимая активация PI3K снижала, а ингибирование PI3K с помощью вортманина увеличивало уровень фосфорилирования ERK (Quintero Barceinas, Garcia-Regalado и др., 2015).

Такой же эффект зарегистрирован для рака молочной железы (MCF7-HER2), где в ERK-зависимый сигналинг вовлечены рецепторы семейства HER. Возможно, что активация RAS/RAF/MEK/ERK-каскада служит для компенсирования ингибированного PI3K-пути (Serra, Scaltriti и др., 2011).

Однако возможен и противоположный эффект PK на данные киназы. Так, в склеральных фибробластах человека (HSF) ATRA вызывает RAR $\beta$ -опосредованную инактивацию ERK и ингибирует пролиферацию (Huo, Cui и др., 2013).

PK-зависимая активация p38 показана на клетках РМЖ MCF7, эмбриональных фибробластах мыши MEF (Bruck, Vitoux и др., 2009), тератокарциномы мыши F9 и рака шейки матки HeLa (Bikkavilli, Feigin и др., 2008). В работах одной группы авторов было показано, что PK по до сих пор малопонятному механизму активирует фосфорилирование p38, что обеспечивает работу коактиваторов RAR, участвующих в ремоделировании и деконденсации хроматина (Gianni, Parrella и др., 2006). Согласно данным этой работы, нетранскрипционная PK-зависимая активация p38 является необходимым условием работы самих белков RAR и реализации канонической активности PK. Показано, что активированная киназа p38

фосфорилирует киназу MSK1, которая, в свою очередь, фосфорилирует RAR $\alpha$  по остатку серина S369, расположенному в лиганд-связывающем домене, что позволяет осуществлять связывание белкового комплекса TFIIH (TranscriptionFactor II H) и последующее фосфорилирование остатка серина S77 в N-терминальном домене RAR $\alpha$  (второе активирующее фосфорилирование, осуществляемое входящим в комплекс циклин-зависимой киназой cdk7/cyclin H). Кроме того, MSK1 фосфорилирует гистон H3 по сайту S10. В итоге, каскад фосфорилирования, инициированный p38-MSK1, обеспечивает транслокацию комплекса RAR $\alpha$ /TFIIH к RARE элементам промоторов целевых генов и активирует их транскрипцию. Таким образом, например, происходит регуляция экспрессии гена CYP26A1. Важно, что опухолевые клетки, в которых происходит дерегулирование p38MAPK/MSK1 пути, не отвечают на стимуляцию РК. Соответственно, РК-резистентные клетки РМЖ SKBR3, в отличие от чувствительных клеток MCF7, характеризовались отсутствием РК-зависимой активации p38MAPK/MSK1 каскада и усиления экспрессии CYP26A1 в ответ на РК (Bruck, Vitoux и др., 2009).

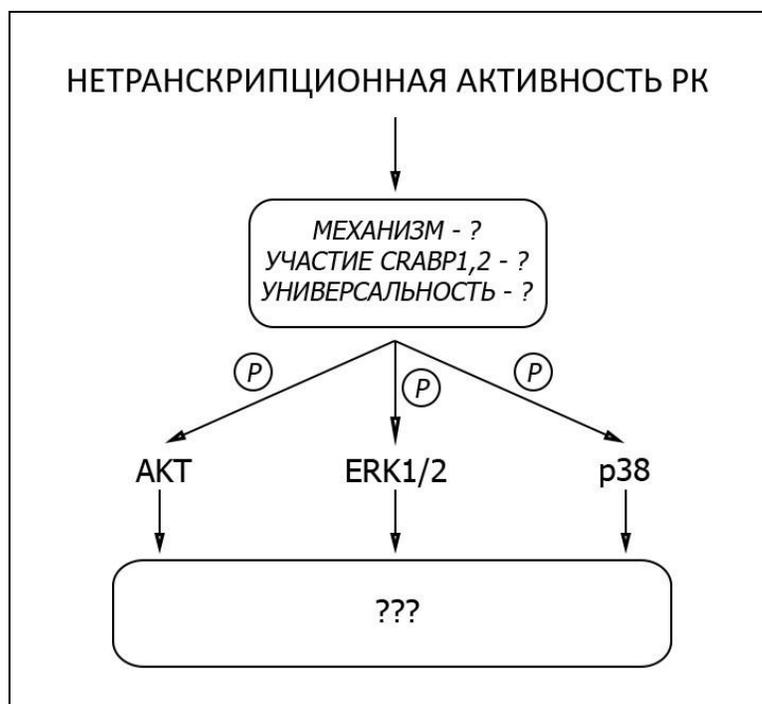
Интересно, что таким же образом может происходить и активация экспрессии RAR $\beta$ , обладающего опухоль-супрессорными функциями, эпигенетическое подавление которого связывают с РК-резистентностью. Согласно данным другой работы, описанные события происходят на плазматической мембране (Piskunov, Rochette-Egly, 2012), где РК стимулирует пул молекул RAR $\alpha$ , локализованных в липидных рафтах, к образованию комплекса с заякоренным там белком Gaq (G protein alpha), что является необходимым условием активации p38 в ответ на РК. При этом РК-резистентные клетки РМЖ (BT474, SKBR3, MDA-MB453 и MDA-MB361)

характеризовались отсутствием или снижением активации p38MAPK, а присутствующий на мембранных рафтах RAR $\alpha$  не связывался с белком G $\alpha$ q. Эти данные указывают на то, что активация p38 является важнейшим фактором, определяющим чувствительность клеток к РК и обеспечивающим ее каноническую активность.

В тоже время, данные других авторов, исследовавших эффект РК-зависимой активации p38 на клетках MCF7 и линии острого промиелоцитарного лейкоза, с одной стороны подтверждают его отсутствие в РК-резистентных клетках, что указывает на необходимость активации p38 для проведения канонической активности РК и поддержания чувствительности к ней. С другой стороны, авторы показали, что РК-зависимая активация p38 приводит к негативной регуляции дифференцировки, то есть снижает классический эффект РК. Более того, подавление РК-зависимой активации p38 не только не уменьшало экспрессию ретиноид-респонсивных генов, но и приводило к усилению дифференцировки и РК-зависимого подавления пролиферации (Alsayed, Uddin и др., 2001). По данным авторов, эффект РК в отношении активации p38 реализовывался посредством RAR-зависимой стимуляции малой ГТФазы Ras и сопровождался активностью MAPKAPK-2 киназы, которая является субстратом p38.

Как видно из представленных данных, ситуация с РК-зависимой нетранскрипционной активацией важнейших регуляторных сигнальных путей мало понятна и довольно противоречива даже в рамках исследований одного сигнального пути. На различных моделях наблюдались принципиально разные молекулярные механизмы доставки РК и передачи сигнала активации киназам. Так, в одних клеточных линиях активация одной

и той же киназы опосредована рецептором RAR $\alpha$ , а в других - требует участия RAR $\gamma$  или вообще не нуждается в участии рецепторов этого семейства. Кроме того, для данных киназ показан широкий спектр последующих мишеней активации, которые также различаются в разных линиях и определяют эффект воздействия на клетку: от стимуляции пролиферации и увеличения миграции до задержки клеточного цикла и апоптоза. Возможно, неканоническая активность РК характеризуется тканевой специфичностью и может оказывать на различные опухоли противоположное действие. Одним из механизмов, обуславливающих такие различия, может быть различное соотношение в опухолевых клетках разных ядерных рецепторов РК, а также белков, связывающих ретиноевую кислоту.



**Рисунок 6.** Неканоническая активность ретиноевой кислоты

Таким образом, нетранскрипционная активность РК изучена очень мало и показана лишь на нескольких линиях клеток. Остается вопрос о том,

насколько универсальной является эта активность, то есть присутствует ли данный эффект РК в клетках различного гистогенеза. Также ранее не исследовалось, какова динамика РК-зависимой нетранскрипционной активации различных протеинкиназ в одних и тех же клетках. Наконец остается открытым вопрос об участии CRABP1 в реализации активности РК (как неканонической, так и транскрипционной) (Рисунок 6). В нашей работе мы начали исследование данных вопросов.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

### **1. Клеточные линии и условия культивации**

В данном исследовании использовали следующие клеточные линии: MDA-MB-231 – рак молочной железы, MCF7 – рак молочной железы, SK-N-AS - нейробластома, SH-SY-5Y – нейробластома, LN229 - глиобластома, U87 – глиобластома. Для получения ретровирусных частиц использовалась производная линия эпителиальных клеток HEK-293 (эмбриональные клетки почек человека) - GP293 (Clonotech). Клеточные линии культивировались при +37 °С в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (5% CO<sub>2</sub>). В качестве клеточной среды использовали среду DMEM, (10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (FBS, PAA Laboratories), 0,294 мг/мл L-глутамина, 100 ед/мл пенициллина, 0,1 мг/мл стрептомицина).

### **2. Стимуляция клеток полностью ретиноевой кислотой (ATRA)**

Клеточные культуры глиобластомы (LN229) и рака молочной железы (MDA-MB-231) сажали в 60-мм чашки по 8x10<sup>5</sup> клеток на чашку. В случае экспериментов, включающих «голодание», на следующий день меняли им среду на DMEM без FBS на 18 часов. В случае экспериментов без «голодания» клетки постоянно культивировали на среде DMEM с 10% FBS. Затем меняли среду на DMEM с 10% FBS с добавлением ATRA (раствор в DMSO) в концентрации 5 μm и инкубировали 5, 15, 30, 60, 240 минут, либо 5, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240 минут, одну чашку оставляли без стимуляции ATRA в качестве контроля. Затем клетки лизировали и проводили выделение белков, а также дальнейший анализ методом иммуноблоттинга.

### 3. Выделение плазмидной ДНК

Отдельно растущую колонию клеток *E.coli*, трансформированных плазмидой, перекалывали с чашки с LB-агаром (50 мкг ампициллина /мл агара) в 10 мл среды LB с такой же концентрацией ампициллина. Бактериальные клетки, интенсивно перемешивая (200 об/мин), наращивали при +37°C в течение ночи. Затем методом щелочного лизиса из клеток *E.coli* выделяли плазмидную ДНК. Среду с бактериями центрифугировали (3000 g, 10 мин, +4 °C), образовавшийся осадок, содержащий бактериальные клетки, ресуспендировали в 150 мкл раствора 1 и инкубировали на льду в течение 5 мин. После этого в пробирку вносили лизирующий раствор 2 (400 мкл), перемешивали содержимое и инкубировали на льду 5 мин до полного лизиса клеток. Затем добавляли раствор 3 (250 мкл), пробирку активно встряхивали несколько раз и отделяли осадок, содержащий компоненты клеточной стенки, выпавшие в осадок белки и геномную ДНК бактерий, путем центрифугирования (10000-15000g, 15 мин). Супернатант переносили в чистые пробирки и приливали холодный изопропиловый спирт (500 мкл). Полученную смесь центрифугировали в течение 10 мин (10000-15000 g). Супернатант удаляли, осадок промывали этиловым спиртом (70%) и просушивали, а затем растворяли в водном растворе РНКазы А (200 мкл 100-200 мкг/мл) и в течение 15-30 мин выдерживали при +37 оС для эффективной деградации бактериальной РНК. Затем к раствору приливали равный объем смеси фенола и хлороформа (1:1) и тщательно перемешивали, после чего проводили центрифугирование (10 мин, при 15000 g). Верхнюю водную фазу аккуратно отбирали в чистую пробирку, затем проводили процедуру еще раз. Далее к водной фазе приливали равный объем хлороформа, пробирку интенсивно встряхивали и центрифугировали (5 мин, 15000 g). Супернатант

отбирали, а содержащуюся в нем плазмидную ДНК пересаждали 2,5 объемами этилового спирта (96%, 0,1M NaCl), затем смесь инкубировали при -20 °C в течение 20 мин и снова проводили центрифугирование (10 мин, 10000-15000 g). Полученный садок промывали этиловым спиртом (70%), просушивали и растворяли в воде (50 мкл). Концентрацию плазмидной ДНК определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop ® ND-1000 («NanoDrop Technologies Inc.», США).

#### **4. Трансформация компетентных клеток *E. coli***

Для трансформации к компетентным клеткам (100 мкл) на холоде добавляли плазмидную ДНК (50 нг) и инкубировали на льду в течение 30 мин. Затем клетки в течение 90 с подвергались тепловому шоку при +42°C, и еще 5 мин инкубировались на льду. После этого к клеткам добавляли среду LB (900 мкл) и инкубировали 60 мин при температуре +37 °C. Затем проводили центрифугирование полученной клеточной суспензии (10 мин, 3000 g), клеточный осадок высевали на чашки с LB-агаром, содержащим ампициллин (50 мкг/мл). Засеянные чашки сутки инкубировались при температуре +37 °C. Плазмидная ДНК полученных клонов анализировалась с помощью рестрицирующих эндонуклеаз, ПЦР *in situ*, и секвенирования.

#### **5. Трансфекция**

Трансфецируемые клетки GP-293 культивировали в 10-см чашках, а затем высаживали на 6-см чашки или на 6-луночные планшеты и культивировали до достижения конфлюентности 70%. Для трансфекции брали 2 мкг смешанных в эквимольном соотношении плазмид: плазмиды

pVSVG (Clontech), кодирующей белок оболочки вируса везикулярного стоматита, и ретровирусного вектора pLXSN (Clontech) (с заклонированным целевым геном либо «пустого», используемого в качестве контроля). Трансфекция проводилась в присутствии липофектамина 2000 (Lipofectamin 2000<sup>TM</sup> Reagent, Invitrogen, США) в соответствии с протоколом производителя. Образованные псевдовиральные частицы собирали из чашки вместе с культуральной средой в несколько приемов через 24, 48 и 72 часа, затем центрифугированием (10 мин, 1500g) удаляли из раствора клеточные обломки и отбирали надосадочную жидкость для последующей инфекции. В данной работе использовался псевдоретровирусный вектор – плазида, в которую сотрудниками лаборатории ранее была вставлена последовательность гена CRABP1: АТТСТСГАГССАССАТГСССААСТТС

## **6. Инфекция псевдовиральными частицами**

Инфицирование проводили в 6-луночных планшетах. Клетки-мишени MDA-MB-231 рассеивали в 2 мл среды и культивировали до достижения конфлюентности 20-30%. Затем среду заменяли на смесь раствора, содержащего вирусные частицы, и среды DMEM (1:1) и добавляли полибрен (Sigma) в концентрации 8 мкг/мл. Использовали 24, 48 и 72-часовые инокуляты псевдовиральных частиц. По окончании инфицирования клетки наращивали в течение 2 суток, а затем пересеивали на 6-см чашки Петри для последующей селекции. Отбор клеток, инфицированных ретровирусными частицами, проводили на антибиотике генцитине (G418, Sigma) в течение 10 суток. Среду с антибиотиком меняли каждые 2-3 дня. Концентрация генцитина для селекции клеток линии MDA-MB-231 была подобрана заранее

и составляла 1000 мкг/мл. По окончании отбора клетки наращивались до субконфлюентного состояния, затем их замораживали в эмбриональной сыворотке (10% ДМСО) при  $-70^{\circ}\text{C}$ . Для последующих экспериментов использовали размороженные аликвоты полученных клеток.

## **7. Приготовление клеточных лизатов**

Лизаты готовились из клеток, достигших субконфлюентного субконфлюентного монослоя на 6-см чашках. Клетки снимали в 1 мл раствора Версена, затем осаждали 6-минутным центрифугированием (3600g) и удаляли надосадочную жидкость. Далее осажденные клетки лизировали в буфере для приготовления лизатов (RIPA, 100 мкл), содержащем смесь коктейля ингибиторов протеаз (Roche) и коктейля ингибиторов фосфатаз (Thermo Scientific). Клетки лизировали при интенсивном перемешивании в течение 30 минут на холоде ( $4^{\circ}\text{C}$ ), затем осаждали клеточный дебрис центрифугированием (10 мин, 15000 g). Надосадочную жидкость разливали по аликвотам 30 мкл и хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$ .

## **8. Вестерн-блот гибридизация**

Для определения количества активируемого или экспрессируемого белка в клеточных лизатах сначала растворы нормализовали по количеству содержащегося в них белка. Для этого концентрацию белка измеряли по методу Бредфорда, а затем готовили пробы, содержащие 20 мкг белка, 4x буфер, содержащий краситель, SDS,  $\beta$ -меркаптоэтанол и т.д. (см. растворы, реагенты и среды) и доводили объем до 20 мкл лизирующим буфером (RIPA). Полученные пробы кипятили в течение 10 минут при  $95^{\circ}\text{C}$ , а затем

охлаждали. Конденсат, образовавшийся на стенках пробирок при охлаждении, сбрасывали при кратковременном центрифугировании. Затем пробы тщательно размешивали и вносили по 20 мкл в лунки геля. Электрофоретическое разделение белков проводили в 10-15%-SDS-ПААГ в трис-глициновом буфере. Затем белки переносили на PVDF мембрану (Millipore) в трансфер-буфере в течение 1 часа (100 В, 250 мА, прибор Mini Trans-Blot, Bio-Rad Laboratories GmbH). Для идентификации места расположения целевых белков и определения качества переноса мембрану окрашивали неспецифическим белковым красителем Ponceau S (Sigma). Далее для предотвращения неспецифического связывания антител мембрану 1 час выдерживали в блокирующем растворе (5% BSA (PAA Laboratoties GmbH или 5% обезжиренное молоко (BioRad)), 0,1% TWEEN-20 (MP Biomedicals, LLC) в TBS) при комнатной температуре. После этого мембрану оставляли на ночь инкубироваться с первичными антителами при постоянном покачивании и отмывали в TBS, содержащем 0,1% TWEEN-20 3 раза (5, 10 и 15 минут) при комнатной температуре. Затем мембрану инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена. После аналогичной отмывки мембрану проявляли с помощью реагента для хемилюминесцентной реакции ECL (Enhanced Chemoluminiscence; Milipore). Хемилюминесцентная реакция регистрировалась на приборе Kodak GelLogic 2200 Imaging system с последующей обработкой в программе Kodak Molecular Imaging Software SE ver. 5.0.1.27. Список использованных антител приведен в **таблице 2**.

**Таблица 2** – Список использованных в работе антител и их разведение

№	Название	Производитель, кат. номер	Разведение
1	Anti-rabbit козы поликлональные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена	Cell Signalling, 29902	1:70000
2	Anti-mouse козы поликлональные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена	Cell Signalling, 2367	1:5000
3	Anti-beta-actin кроличьи поликлональные антитела	Abcam, ab8227	1:5000
4	Anti-beta-tubulin кроличьи моноклональные антитела	Abcam, ab52623	1:1000
5	Anti-CRABP1 кроличьи моноклональные антитела	Abcam, ab2816	1:1000
6	Anti-pAKT (S473) кроличьи моноклональные антитела	Cell Signalling, 4060S	1:2000
7	Anti-pERK-1/2 (T202/Y204) мышьиные моноклональные антитела	Cell Signalling, 9106S	1:1000
8	Anti-p38 (T180/Y182) кроличьи поликлональные антитела	Abcam, ab4822	1:1000

## 9. Денситометрический анализ

Для количественной оценки исследуемых белков при иммуноблоттинге использовали метод денситометрического обсчета. Денситометрия

производилась в программе ImageJ согласно рекомендациям фирмы-производителя. Интенсивность светимости белков вначале приводилась к интенсивности светимости белка «домашнего хозяйства» (в работе использовали  $\beta$ -актин и  $\beta$ -тубулин). Затем полученные относительные значения светимости целевых белков соотносили между собой в соответствующих группах сравнения (образцы с разным временем инкубации с ATRA)

## **10. Растворы, реагенты и среды**

1. Среда DMEM для культивирования эукариотических клеток (ПанЭко, Россия)
2. Раствор Версена (ПанЭко, Россия)
3. Эмбриональная сыворотка крупного рогатого скота (PAA laboratories)
4. Среда LB для культивирования бактерий (на 1 л: NaCl 10 г, пептон 10 г, дрожжевой экстракт 5 г)
5. LB-агар (на 1 л: бакто-триптон 10 г, бакто-дрожжевой экстракт 5 г, NaCl 10 г)
6. Раствор 1 для выделения плазмидной ДНК (25mM Tris-HCl pH 8,0, 10mM ЭДТА)
7. Раствор 2 для выделения плазмидной ДНК (0,2N NaOH, 1% SDS)
8. Раствор 3 для выделения плазмидной ДНК (3M AcONa, pH 5,0)
9. Акриламид (стоковый раствор): 29% акриламид, 1% бисакриламид.
10. 4x буфер для нанесения на белковый форец (0,2 M Tris-HCl, pH 6,8, 4% SDS, 40% глицерин, 0,4 M  $\beta$ -MeEtOH, 0,01% бромфеноловый синий)

11. Буфер для приготовления белковых лизатов (RIPA) (100 мМ NaCl, 10 мМ Tris-HCl, pH 7.8, 10 мМ ЭДТА, 1% Triton X-100, 10% глицерин, 0.1% SDS, 0.5% деоксихолат натрия, 0.05 мМ NaVO<sub>4</sub>, 10 мМ NaF, protease inhibitor cocktail (Roche, Швейцария), 1 мМ DTT)
12. Трис-глициновый буфер для электрофореза белков pH 8,5 (0,25M Tris-HCl, 1,92M глицин, 1% SDS)
13. Буфер для переноса белков на PVDF мембрану 10x (на 500 мл: Tris-base 15,4 г, глицин 72,02 г) на 500 мл 1x буфера 100 мл 96% этилового спирта
14. TBS 10x pH 7,6 (на 500 мл: Tris-base 6,06 г, NaCl 43,83 г)
15. Ponceau S staining solution (Ponceau S (Sigma) 1 г, уксусная кислота 2,5 мл, MQ до 50 мл)
16. G418, генцитин (Sigma)
17. ATRA (Sigma)
18. DMSO (Sigma)
19. Использованные плазмиды: pLXSN-neo (Clontech); pVSV-G (Clontech).

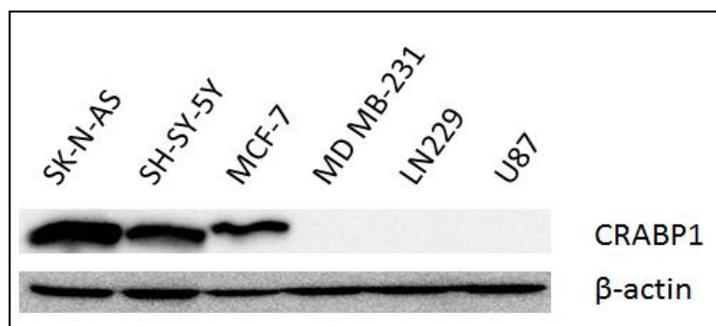
## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

Эффект нетранскрипционной активности РК ранее был показан в отношении некоторых протеинкиназ лишь на трех типах клеток: линии клеток нейробластомы (SH-SY-5Y), немелкоклеточного рака легкого (A549) и рака молочной железы (MCF7). На других линиях клеток человека данный эффект ранее не изучался. Кроме того, не изучалось участие белков, связывающих РК, в реализации неканонической активности РК, за исключением работы (Persaud, Lin и др., 2013), где указывалось, что активность CRABP1 необходима для осуществления нетранскрипционной активности РК. Однако, по данным, ранее полученным в лаборатории, и работе, посвященной исследованию действия РК на линию немелкоклеточного рака легких A549 (García-Regalado, Vargas и др., 2013), неканоническая активность РК обнаруживается и в клетках, не экспрессирующих CRABP1. Таким образом, остается неизвестным, насколько универсален эффект нетранскрипционной активности РК для клеток различного происхождения, какова его динамика, и как на него влияет экспрессия CRABP1. Первым этапом работ был анализ продукции белка CRABP1 в линиях клеток различного происхождения и выбор модели для исследования нетранскрипционной активности РК.

### **1. Сравнение эндогенного уровня экспрессии CRABP1 в клетках различного происхождения**

Для исследования влияния белка CRABP1 на фосфорилирование протеинкиназ был проведен анализ эндогенной экспрессии данного белка в клетках различного происхождения: клетках нейробластомы SH-SY-5Y, SK-

N-AS, клетках РМЖ MCF7, MDA-MB-231 и клетках глиобластомы LN229, U87. Для этого клетки рассаживали на 60-мм чашки Петри и культивировали в стандартных условиях. По достижении субконфлюентного монослоя (80% конфлюентности) клетки лизировали, измеряли концентрацию белков по методу Бредфорда, готовили пробы, содержащие по 20 мкг белка, и проводили разделение белков по электрофоретической подвижности в 15% ПААГ. Уровень CRABP1 определяли с помощью Вестерн-блот гибридизации, в качестве контроля нанесения количества белка использовали гибридизацию с антителами к белку «домашнего хозяйства»  $\beta$ -актину. Результаты анализа экспрессии представлены на рисунке 7. CRABP1 не был обнаружен в клетках MDA-MB-231, LN229 и U87.



*Рисунок 7. Анализ уровня белка CRABP1 в линиях различного происхождения методом иммуноблоттинга.*

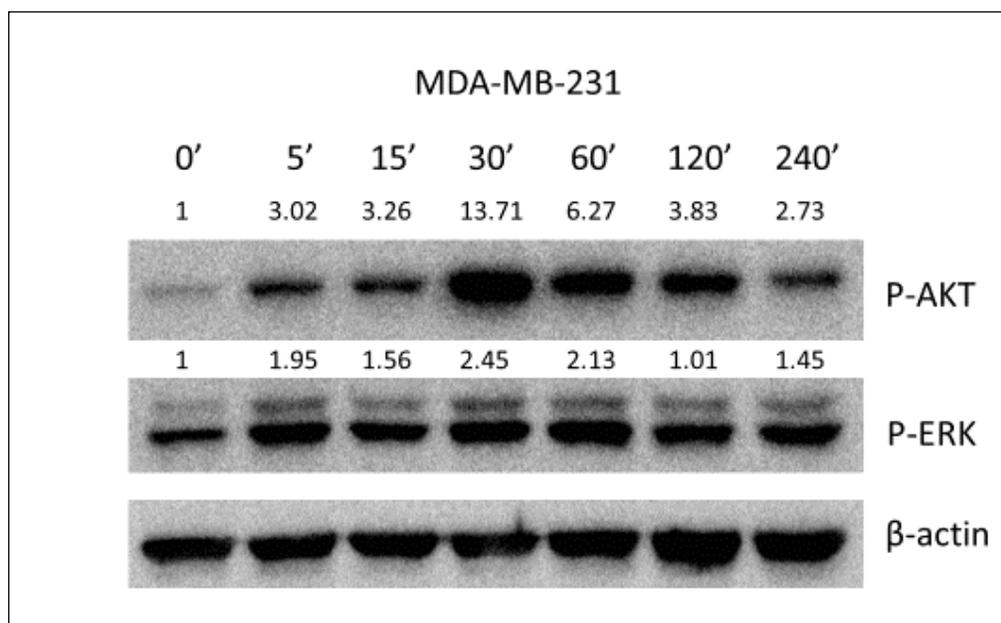
Нужно отметить, что в отличие от CRABP2, который экспрессируется в большинстве клеток, CRABP1 в значительных количествах обычно не обнаруживается и, по данным литературы, экспрессируется лишь в некоторых типах клеток. Поэтому для дальнейших экспериментов мы выбрали линии различного происхождения, где также, как и в ранее исследованных в этом отношении клетках (линия НМРЛ А549) отсутствовала эндогенная экспрессия CRABP1: линию РМЖ MDA-MB-231 и глиобластомы

LN229. В тоже время, обнаружение продукции CRABP1 в обеих линиях неробластомы и клетках РМЖ MCF7 открывает в перспективе редкую возможность подавления обоих гомологов в одних и тех же клетках и последующего сравнения влияния CRABP1 и CRABP2 на активность РК.

Интересно, что по результатам анализа экспрессия CRABP1 наблюдается в клетках нейробластомы (SH-SY-5Y, SK-N-AS) – опухолей, чувствительных к действию РК, и отсутствует в клетках глиобластомы (LN229, U87) а также в ранее исследованной линии НМПЛ А549, для которых показана РК-резистентность. Более того, экспрессия CRABP1 различается для клеток одного происхождения (РМЖ), но разной степени злокачественности: в менее агрессивных клетках MCF7 она наблюдается, а в более агрессивных отсутствует. Это может свидетельствовать в пользу гипотезы о том, что CRABP1 выполняет в клетках функцию секвестрирования РК и регуляции ее биодоступности, поэтому перестает экспрессироваться в более злокачественных опухолях, устойчивых к РК. Иными словами, клетки, устойчивые к действию РК, не «нуждаются» в предохранении от избытка РК – предполагаемой функции CRABP1. Также эта гипотеза подтверждается литературными данными о том, что в высоко агрессивных опухолях или на поздних стадиях опухолевой прогрессии промотор гена CRABP1 часто метилирован, как это было показано при раке печени (Lee, Kim и др., 2009), раке пищевода (Tanaka, Imoto и др., 2007), раке щитовидной железы (Huang, de la Chapelle и др., 2003) и при раке толстой кишки (Lind, Kleivi и др., 2006).

## **2. Анализ РК-зависимой активации протеинкиназ АКТ и ERK1/2 в клеточной линии рака молочной железы MDA-MB-231 и глиобластомы LN229**

Для исследования влияния РК на активность протеинкиназ были подобраны условия, концентрация АТРА и временные промежутки стимуляции (5-240 минут). Клетки рассаживали на 60-мм чашки Петри и культивировали в стандартных условиях. Затем клетки подвергали «голоданию» в течение 18 часов на бессывороточной среде, после чего приливали среду с FBS (10%) и АТРА (5 мкМ) и инкубировали в течение установленных промежутков времени. Далее клетки снимали с чашек раствором Версена, лизировали и определяли уровень активирующего фосфорилирования АКТ по сайту Ser473 и ERK1/2 по сайтам Thr202/Tyr204. Анализ проводили методом иммуноблоттинга с использованием антител к фосфорилированным по данным положениям белкам. Электрофорез проводили в 10% ПААГ. Анализ обоих белков проводили параллельно в одном эксперименте для возможности адекватного сравнения. Для этой задачи общую мембрану разрезали горизонтально в соответствии с диапазонами молекулярного веса исследуемых белков, полученные фрагменты гибридизовали с соответствующими антителами. Результаты представлены на рисунке 8.

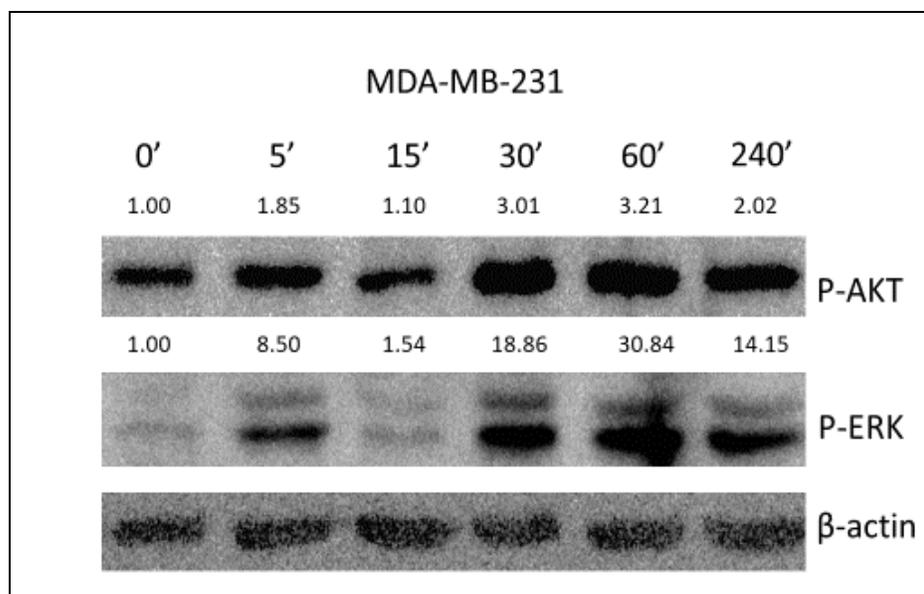


**Рисунок 8.** Сравнительный анализ уровней активирующего фосфорилирования АКТ и ERK1/2 при различном времени инкубации с АТРА в клетках РМЖ MDA-MB-231 с предварительным голоданием. Метод – иммуноблоттинг. Цифрами указаны результаты денситометрического анализа светимости полос с учетом анализа белка «домашнего хозяйства»,  $\beta$ -актина.

Как видно из представленных данных, в случае АКТ активирующее фосфорилирование заметно уже через 5 минут инкубации с АТРА, а пик активации приходится на 30-60 минут. Далее наблюдается плавное снижение уровня фосфорилирования, при этом к точке 240 минут он все еще превышает уровень контроля. Схожая, хотя и менее выраженная картина наблюдается и для ERK1/2. Активация возникает на 5 минутах, к 15 уровень фосфорилированной ERK1/2 немного снижается, затем возрастает, достигает максимума к 30-60 минутам и далее снижается до уровня, превышающего тем не менее контрольный. Такая динамика фосфорилирования свидетельствует о том, что нетранскрипционная

(кратковременная - менее 2-х часов) активация киназ предшествует транскрипционной, но значительного разрыва (падения уровня фосфорилирования до контрольного уровня) между ними не наблюдается, то есть более сильная неканоническая активность РК в отношении данных киназ плавно переходит в менее выраженную транскрипционную. Возможно, это связано с тем, что нетранскрипционная активность РК необходима для осуществления ее транскрипционной активности, как это было показано в отношении РК-зависимой активации протеинкиназы p38 (Gianni, Parrella и др., 2006)

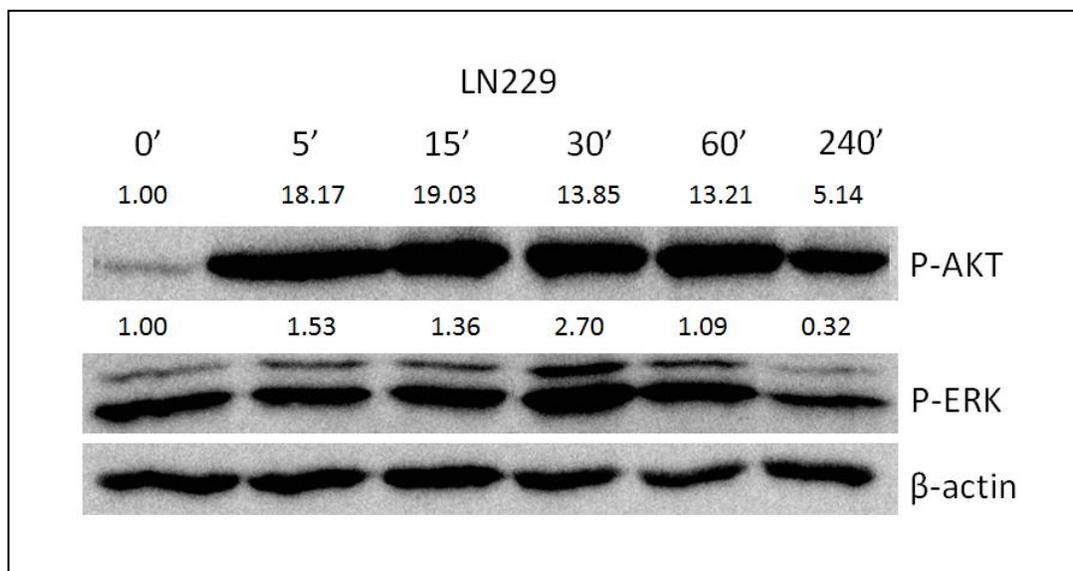
Как уже говорилось, в данных экспериментах клетки инкубировались с РК параллельно с добавлением сыворотки после голодания в соответствии с методиками, приведенными в статьях по неканонической активности РК (García-Regalado, Vargas и др., 2013). Однако при такой постановке эксперимента остается вопрос, не является ли эффект активации киназ результатом воздействия FBS после голодания. Для проверки данного вопроса мы провели аналогичный эксперимент без голодания (то есть АТРА добавляли клеткам при культивировании в стандартной среде ДМЕМ с 10% FBS) и обнаружили достаточно сходную картину (Рисунок 9), которая подтверждает, что активационное фосфорилирование исследуемых киназ не является эффектом сыворотки. Причем в случае ERK различия в уровне фосфорилирования (активация на 5 минутах и падение в точке 15 мин) были выражены существенно больше при такой постановке эксперимента, а в случае АКТ, наоборот, были выражены меньше. Это связано с тем, что исходный уровень АКТ в условиях роста в присутствии сыворотки (точка 0) достаточно высокий, в отличие от Erk1/2, уровень которой, наоборот, низкий при стандартном культивировании и высокий при голодании.



**Рисунок 9.** Сравнительный анализ уровней активирующего фосфорилирования АКТ и ERK1/2 при различном времени инкубации с ATRA в среде с 10% FBS в клетках РМЖ MDA-MB-231 Метод – иммуноблоттинг. Цифрами указаны результаты денситометрического анализа светимости полос с учетом анализа белка «домашнего хозяйства»,  $\beta$ -актина.

Поэтому далее мы решили анализировать активацию АКТ, используя предварительное голодание. Напротив, активацию ERK1/2 в клетках MDA-MB-231 далее решено было исследовать без голодания, поскольку на бессывороточной среде контрольный уровень фосфорилированной ERK1/2 значительно повышается (Рисунок 8), что затрудняет сравнение дальнейшего повышения уровня активной формы данной киназы.

Аналогичные эксперименты (по методике, включающей «голодание») были поставлены на клетках глиобластомы LN229. В первом эксперименте сравнивали профили активации АКТ и ERK1/2. Результаты представлены на рисунке 10.



**Рисунок 10.** Сравнительный анализ уровней активирующего фосфорилирования АКТ и ERK1/2 при различном времени инкубации с ATRA в клетках глиобластомы LN229 с предварительным голоданием. Метод – иммуноблоттинг. Цифрами указаны результаты денситометрического анализа светимости полос с учетом анализа белка «домашнего хозяйства»,  $\beta$ -актина.

В случае АКТ наблюдалась несколько отличная картина в сравнении с клетками MDA-MB-231: максимальная активации наблюдалась уже на 5 минутах инкубации, продолжалась до 60 минут и снижалась к 240 минутам до уровня, превышающего контрольный.

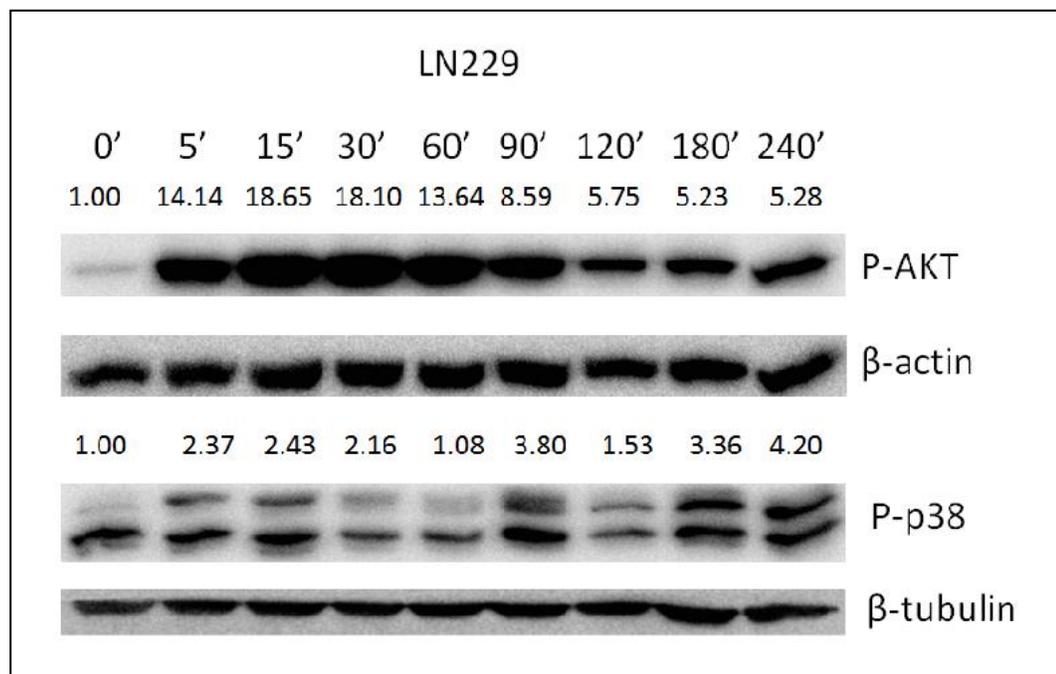
Активация ERK1/2 в этих условиях была выражена слабо, однако и тут отмечалось увеличение фосфорилирования при 30 минутах инкубации, при этом на 5 минутах повышение уровня фосфорилированной киназы наблюдалось незначительное (в 1.5 раза). Надо отметить, что на обеих клеточных линиях (LN229 и MDA-MB-23)1 как в ходе данной работы, так и ранее в лаборатории, было показано, что голодание значительно повышает

уровень p-ERK, что осложняет оценку ее активации в таких условиях эксперимента. Далее для более строгой оценки неканонической активности ATRA в отношении ERK1/2 планируется повторить данный эксперимент без предварительного голодания, либо использовать большее разведение антител к данному белку при методике, включающей «голодание» - второй вариант кажется предпочтительнее, поскольку позволит проводить анализ обоих белков (AKT и ERK1/2) в одном эксперименте.

В следующих экспериментах мы сравнивали уровни активирующего фосфорилирования киназ AKT и p38 в клетках LN229 в тех же условиях, но с большим количеством временных точек. Для AKT подтвердились результаты, полученные в предыдущем эксперименте (Рисунок 11), то есть наблюдался единый пик активации с 5 до 60 минут, с 90 минут начиналось снижение, которое продолжалось на 120 минутах, и далее уровень фосфорилирования оставался неизменным. Таким образом, можно разделить во времени две фазы активации, соответствующие, по-видимому, неканонической и транскрипционной активности PK, причем уровень нетранскрипционной активации выше, чем транскрипционной.

Динамика фосфорилирования протеинкиназы p38 выглядела совсем иначе, чем протеинкиназ AKT и ERK1/2. Наблюдалось три отдельных пика фосфорилирования, при этом в промежутках регистрировалось падение до контрольного уровня или даже ниже. Таким образом, в клетках LN229 по сравнению с клетками MDA-MB-231 PK-зависимая активация киназ ERK1/2 и в особенности AKT имела заметные отличия – уровень фосфорилирования при краткосрочной инкубации в период 5-60 (90) минут (нетранскрипционная активация) значительно превышал таковой при

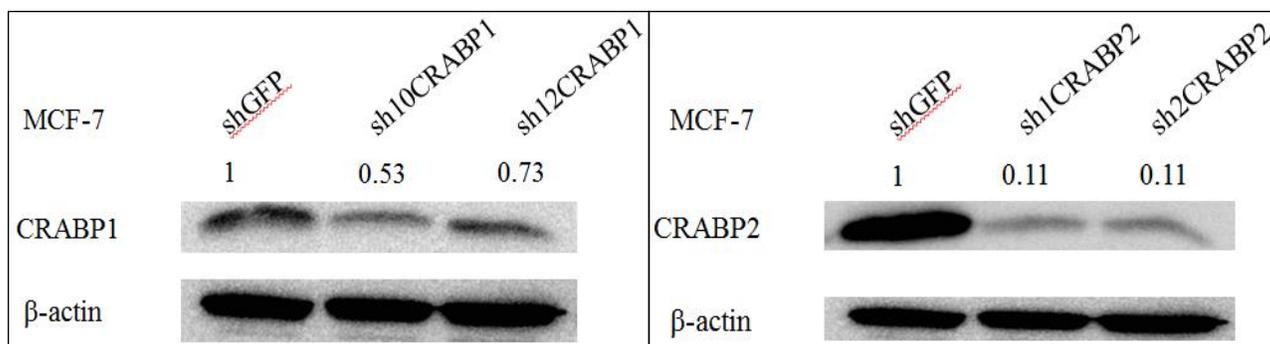
длительной инкубации с РК (выраженное снижение начиная со 120 минут инкубации и далее – транскрипционная активация). Неканоническая и каноническая активность РК в отношении фосфорилирования p38 разделена во времени что, по-видимому, свидетельствует о том, что процессы неканонической и транскрипционной активации для этой киназы не связаны. Обращает на себя внимание, что второй пик фосфорилирования на 90 минутам возникает в «пограничное» время между временем, соответствующим нетранскрипционной и транскрипционной активации.



**Рисунок 11.** Сравнительный анализ уровней активирующего фосфорилирования АКТ и p38 при различном времени инкубации с АТРА в клетках глиобластомы LN229 с предварительным голоданием. Метод – иммуноблоттинг. Цифрами указаны результаты денситометрического анализа светимости полос с учетом анализа белков «домашнего хозяйства», β-атина (для АКТ) и β-тубулина (для p38).

### 3. Анализ влияния подавления экспрессии CRABP1, и CRABP2 на активность протеинкиназы ERK1/2 в клетках РМЖ MCF7

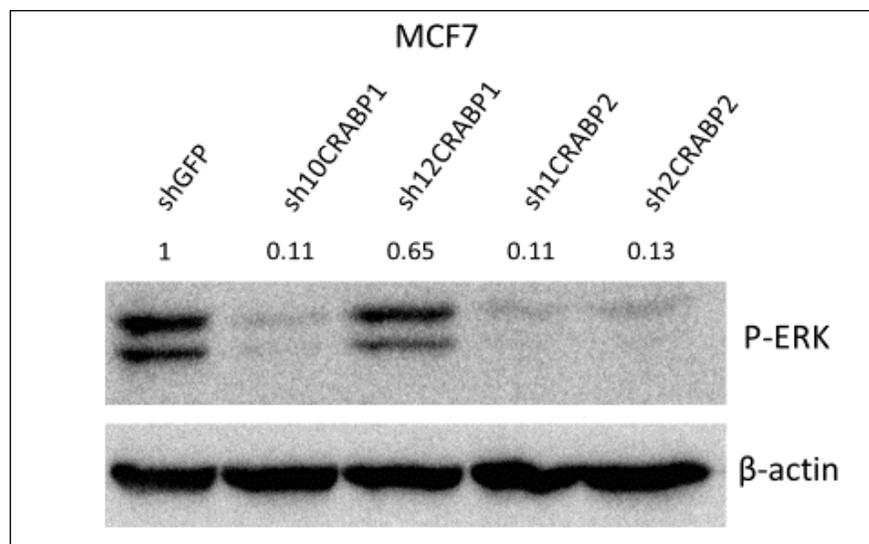
Далее мы исследовали возможное влияние белков CRABP1 и CRABP2 на уровень активности протеинкиназы ERK1/2 в условиях стандартного культивирования, то есть без дополнительной стимуляции в присутствии РК. Для этого была использована линия MCF7, в которой, как мы показали выше (Рисунок 7), имеется эндогенная экспрессия обоих гомологов CRABP. Для этой линии клеток в лаборатории были получены производные сублинии с подавлением эндогенной экспрессии *CRABP1* и *CRABP2*. На рисунке 12 представлены данные, полученные Егоровой Е.М., иллюстрирующие подавление экспрессии *CRABP1* и *CRABP2* в клетках при трансдукции в них векторов, кодирующих малые шпилечные РНК к последовательностям данных генов. Как видно на рисунке, выраженным нокдауном в отношении *CRABP1* обладала sh10, а в отношении *CRABP2* обе шпилечные структуры sh1 и sh2.



**Рисунок 12.** Результаты анализа продукции белков *CRABP1* и *CRABP2* в производных линиях MCF-7shGFP, MCF-7sh10CRABP1, MCF-7sh12CRABP1 с подавлением экспрессии *CRABP1* и в производных линиях MCF-7shGFP, MCF-7sh1CRABP2, MCF-7sh2CRABP2 с подавлением экспрессии *CRABP2* методом

иммуноблоттинга. Цифрами указаны результаты денситометрического анализа светимости полос с учетом анализа белка «домашнего хозяйства»,  $\beta$ -актина. Данные получены Егоровой Е.М.

Для анализа влияния подавления продукции белков CRABP на активность протеинкиназы ERK1/2 исследуемые клетки и клетки контрольной линии (с трансдуцированной последовательностью shGFP к гену зеленого флюоресцентного белка, отсутствующему в геноме человека) рассаживали на 60-мм чашки Петри и культивировали в стандартных условиях. По достижении субконфлюэнтного монослоя (80% конфлюэнтности) клетки лизировали, измеряли концентрацию белков по методу Бредфорд, готовили пробы, содержащие по 20 мкг белка, и проводили разделение белков электрофорезом в 10% ПААГ. Результаты анализа представлены на рисунке 13.



**Рисунок 13.** Сравнительный анализ уровней активирующего фосфорилирования ERK1/2 в линиях MCF7 с подавленными CRABP1 и CRABP2 методом иммуноблоттинга. Цифрами указаны результаты

*денситометрического анализа светимости полос с учетом анализа белка «домашнего хозяйства»,  $\beta$ -актина*

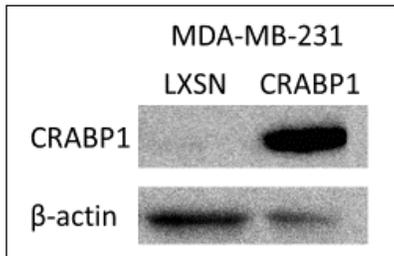
Результаты анализа показали, что подавление CRABP2 (сублинии MCF7 sh1 и MCF7sh,2) привело к резкому снижению (до практически полного отсутствия) уровня активной формы ERK1/2 по сравнению с контролем. В клетках с подавленным CRABP1 (MCF7sh10) фосфорилирование ERK1/2 также практически не детектируется, тогда как в клетках с менее эффективным подавлением CRABP1 (MCF7sh12) снижение активации очень незначительно. В дальнейшем планируется повторно получить линии MCF7sh10 и sh 12, чтобы подтвердить влияние CRABP1 на активацию ERK1/2. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что CRABP2 (а также, предположительно, CRABP1) участвует в активации ERK1/2.

#### **4. Получение линий MDA-MB-231 с гиперэкспрессией CRABP1**

В рамках дальнейшего исследования влияния CRABP1 на активацию ERK1/2 в клетках РМЖ (в перспективе и на РК-зависимую активацию как в результате ее транскрипционной, так и неканонической активности) дальнейшей задачей данной работы было получение сублиний клеток с гиперэкспрессией CRABP1 при отсутствии его эндогенной экспрессии. Для выполнения этой задачи кодирующая последовательность гена *CRABP1* человека в составе ретровирусного вектора рLXSN была трансдуцирована в клетки РМЖ MDA-MB-231 методом ретровирусной инфекции с последующим отбором клеток, экспрессирующих вектор, на генцитине в течение 10 суток. Минимально достаточная концентрация генцитина для селекции была подобрана для клеток MDA-MB-231 и составила 1000 мкг/мл.

Параллельно была получена линия MDA-MB-231 LXSН, экспрессирующая «пустой» вектор.

Далее был проведен анализ продукции белка CRABP1 в производной сублинии, на рисунке 14 представлены результаты сравнения, которые показали высокий уровень экспрессии CRABP1 в клетках MDA-MB-231 CRABP1 по сравнению с контрольной линией LXSН. Полученная сублиния линия будет использована для дальнейшего анализа влияния CRABP1 на активность протеинкиназы Erk1/2.



**Рисунок 14.** Анализ уровня белка CRABP1 в линиях MDA-MB-231 методом иммуноблоттинга.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ретиноевая кислота (РК) – важный природный метаболит ретинола, задействованный в регуляции пролиферации, эмбриогенеза и клеточной дифференцировки. Благодаря про-дифференцировочной активности в канцерогенезе РК выступает в качестве опухолевого супрессора. Для многих типов опухолей показано, что РК снижает способность к неприкрепленному росту и пролиферационную активность опухолевых клеток, активирует апоптоз и подавляет ангиогенез. В настоящее время предпринимаются попытки использования РК и ее аналогов (природных или синтетических ретиноидов) для терапии различных онкологических заболеваний. Однако до сих пор применение РК сильно ограничено, прежде всего за счет быстрого приобретения устойчивости малигнизированными клетками, а в отдельных типах клеток и обратного эффекта РК, способствующего выживанию и пролиферации опухолевых клеток.

Функциональная активность РК в клетке реализуется посредством специфичных ядерных рецепторов RAR и RXR, являющихся транскрипционными факторами. Относительно недавно была показана неканоническая активность РК, связанная с нетранскрипционными механизмами, реализующаяся быстро и без участия ядерных рецепторов (точнее, без участия их транскрипционной активности). Данный эффект показан на нескольких линиях клеток в отношении активации протеинкиназ АКТ, ERK1/2 и p38. По ряду данных, неканоническая активность РК может быть связана с про-туморогенным действием РК, а также с приобретением устойчивости к РК. Однако до сих пор неканоническую активность РК исследовали лишь на трех типах клеток в отношении отдельных

протеинкиназ и никогда не сравнивали эффект РК в отношении различных киназ в клетках различного происхождения.

В данной работе мы впервые показали неканонический эффект РК в отношении протеинкиназ АКТ, ERK и p38 в клетках глиобластомы LN229, а также наблюдали динамику РК-зависимой активности АКТ и ERK в линии РМЖ MDA-MB-231. При этом мы обнаружили, что в клетках LN229 при инкубации с РК имеются две выраженные временные фазы активации киназ ERK1/2 и в особенности АКТ: первая фаза, характеризующаяся максимальным уровнем фосфорилирования при краткосрочной инкубации в период 5-60 (90) минут (соответствующая нетранскрипционной активации) и вторая фаза с менее выраженной активацией - при длительной инкубации (более 120 минут), соответствующая транскрипционной активации. Еще более яркие отличия были обнаружены для киназы p38, уровень фосфорилирования которой демонстрировал три четко разделенных пика – 5-15 минут, 90 минут и после 180 минут инкубации, в промежутках между которыми количество фосфорилированной формы p38 снижалось до уровня контрольного. Таким образом, в линии LN229 нетранскрипционная и транскрипционная активность РК в отношении исследуемых протеинкиназ разделена во времени, причем уровень нетранскрипционной активации данных киназ выше. В клетках MDA-MB-231 различия между кратковременной и длительной РК-зависимой стимуляцией фосфорилирования данных киназ были выражены слабее, что свидетельствует в пользу предположения о связанности процессов неканонической и канонической активности РК в отношении данных киназ в этом типе клеток.

Кроме того, в клетках РМЖ MCF7 мы впервые обнаружили влияние РК-связывающих белков CRABP1 и CRABP2 на активацию ERK в стандартных условиях (без стимуляции РК) – подавление продукции каждого из гомологов приводило к снижению количества активной формы ERK1/2.

В работе также была получена линия производных клеток РМЖ MDA-MB-231 с гиперэкспрессией CRABP1. В дальнейшем планируется провести анализ гиперэкспрессии CRABP1 на активацию MAP-киназ в стандартных условиях культивации, а также на реализацию транскрипционной и нетранскрипционной активности ретиноевой кислоты.

Полученные результаты послужат основой для дальнейших исследований механизмов активности РК и изучения роли белков CRABP1 и CRABP2 в канцерогенезе.

## **ВЫВОДЫ**

1. Обнаружен высокий уровень продукции CRABP1 в РК-чувствительных линиях клеток рака молочной железы (MCF7) и нейробластомы (SH-SY-5Y, SK-N-AS) и отсутствие продукции этого белка в РК-резистентных клетках рака молочной железы (MDA-MB-231) и глиобластомы (LN229, U87).
2. В клетках MDA-MB-231 обнаружено увеличение количества активной формы протеинкиназ АКТ и ERK начиная с 5 минут инкубации с РК с максимумом при 30-60 минутах (нетранскрипционная активность РК), и дальнейшим плавным снижением до уровня, превышающего контрольный (транскрипционная активность РК).
3. В клетках глиобластомы LN229 обнаружен сходный эффект, при этом динамика РК-зависимой активации протеинкиназ АКТ и ERK отличалась от таковой в клетках MDA-MB-231 - обнаружены две временных фазы РК-зависимого фосфорилирования, причем в первой, соответствующей нетранскрипционной активности РК, уровень активации выше. Для р38 наблюдали три выраженных пика РК-зависимой активации.
4. Подавление экспрессии CRABP2 приводит к достоверному снижению уровня фосфорилирования ERK, к аналогичному эффекту предположительно приводит и подавление экспрессии CRABP1.
5. Получена сублиния клеток MDA-MB-231 с гиперэкспрессией CRABP1.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Afonja O., Raaka B.M., Huang A., Das S., Zhao X., Helmer E., Juste D., Samuels H.H., RAR agonists stimulate SOX9 gene expression in breast cancer cell lines: Evidence for a role in retinoid-mediated growth inhibition // *Oncogene*. 2002. V. 21. P. 7850–7860.
2. Alsayed Y., Uddin S., Mahmud N., Lekmine F., Kalvakolanu D. V, Minucci S., Bokoch G., Plataniias L.C., Activation of Rac1 and the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in response to all-trans-retinoic acid. // *J. Biol. Chem*. 2001. V. 276. P. 4012–4019.
3. Åström A., Pettersson U., Krust A., Chambon P., Voorhees J.J., Retinoic acid and synthetic analogs differentially activate retinoic acid receptor dependent transcription // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1990. V. 173. P. 339–345.
4. Bikkavilli R.K., Feigin M.E., Malbon C.C., p38 mitogen-activated protein kinase regulates canonical Wnt-beta-catenin signaling by inactivation of GSK3beta. // *J. Cell Sci*. 2008. V. 121. P. 3598–3607.
5. Bruck N., Vitoux D., Ferry C., Duong V., Bauer A., Thé H. de, Rochette-Egly C., A coordinated phosphorylation cascade initiated by p38MAPK/MSK1 directs RARalpha to target promoters. // *EMBO J*. 2009. V. 28. P. 34–47.
6. Cagnol S., Chambard J.-C., ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death--apoptosis, autophagy and senescence. // *FEBS J*. 2010. V. 277. P. 2–21.
7. Chambard J.-C., Lefloch R., Pouyssegur J., Lenormand P., ERK implication in cell cycle regulation. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2007. V. 1773. P. 1299–1310.
8. Chen J., Somanath P.R., Razorenova O., Chen W.S., Hay N., Bornstein P., Byzova T. V., Akt1 regulates pathological angiogenesis, vascular maturation and

permeability in vivo. // Nat. Med. 2005. V. 11. P. 1188–1196.

9. Chen N., Napoli J.L., All-trans-retinoic acid stimulates translation and induces spine formation in hippocampal neurons through a membrane-associated RARalpha. // FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 2008. V. 22. P. 236–245.

10. Chen W.C., Sass J.O., Seltmann H., Nau H., Orfanos C.E., Zouboulis C.C., Biological effects and metabolism of 9-cis-retinoic acid and its metabolite 9,13-di-cis-retinoic acid in HaCaT keratinocytes in vitro: comparison with all-trans-retinoic acid. // Arch. Dermatol. Res. 2000. V. 292. P. 612–620.

11. Chen W.S., Xu P.Z., Gottlob K., Chen M.L., Sokol K., Shiyanova T., Roninson I., Weng W., Suzuki R., Tobe K., Kadowaki T., Hay N., Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene. // Genes Dev. 2001. V. 15. P. 2203–2208.

12. Cho H., Thorvaldsen J.L., Chu Q., Feng F., Birnbaum M.J., Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 38349–38352.

13. Collins S.J., The role of retinoids and retinoic acid receptors in normal hematopoiesis // Leukemia. 2002. V. 16. P. 1896–1905.

14. Courtois-Cox S., Genter Williams S.M., Reczek E.E., Johnson B.W., McGillicuddy L.T., Johannessen C.M., Hollstein P.E., MacCollin M., Cichowski K., A negative feedback signaling network underlies oncogene-induced senescence. // Cancer Cell. 2006. V. 10. P. 459–472.

15. Curran T., Fos and Jun: oncogenic transcription factors. // Tohoku J. Exp. Med. 1992. V. 168. P. 169–174.

16. Dey N., De P.K., Wang M., Zhang H., Dobrota E.A., Robertson K.A., Durden D.L., CSK controls retinoic acid receptor (RAR) signaling: a RAR-c-SRC signaling axis is required for neuritogenic differentiation. // *Mol. Cell. Biol.* 2007. V. 27. P. 4179–4197.
17. Dilworth F.J., Chambon P., Nuclear receptors coordinate the activities of chromatin remodeling complexes and coactivators to facilitate initiation of transcription. // *Oncogene.* 2001. V. 20. P. 3047–3054.
18. Donato L.J., Noy N., Suppression of mammary carcinoma growth by retinoic acid: Proapoptotic genes are targets for retinoic acid receptor and cellular retinoic acid-binding protein II signaling // *Cancer Res.* 2005. V. 65. P. 8193–8199.
19. Donato L.J., Suh J.H., Noy N., 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.* 2007. V. 67. P. 609–615.
20. Dong D., Ruuska S.E., Levinthal D.J., Noy N., Distinct roles for cellular retinoic acid-binding proteins I and II in regulating signaling by retinoic acid // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 23695–23698.
21. Drosopoulos K.G., Roberts M.L., Cermak L., Sasazuki T., Shirasawa S., Andera L., Pintzas A., Transformation by oncogenic RAS sensitizes human colon cells to TRAIL-induced apoptosis by up-regulating death receptor 4 and death receptor 5 through a MEK-dependent pathway. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 22856–22867.
22. Du K., Montminy M., CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 32377–32379.
23. Dutta A., Sen T., Chatterjee A., All-trans retinoic acid (ATRA) downregulates

- MMP-9 by modulating its regulatory molecules. // *Cell Adh. Migr.* 2010. V. 4. P. 409–418.
24. Dvorak C.C., Sanders R.P., Dahl G.V.H., Donaldson S.S., Razzouk B.I., Reinduction of relapsed acute promyelocytic leukemia with ATRA and low dose antimetabolite-based chemotherapy // *Pediatr. Blood Cancer.* 2007. V. 48. P. 582–585.
25. Eichele G., Retinoids and vertebrate limb pattern formation // *Trends Genet.* 1989. V. 5. P. 246–251.
26. Engel K., Kotlyarov A., Gaestel M., Leptomycin B-sensitive nuclear export of MAPKAP kinase 2 is regulated by phosphorylation. // *EMBO J.* 1998. V. 17. P. 3363–3371.
27. Freemantle S.J., Spinella M.J., Dmitrovsky E., Retinoids in cancer therapy and chemoprevention: promise meets resistance. // *Oncogene.* 2003. V. 22. P. 7305–15.
28. García-Regalado A., Vargas M., García-Carrancá A., Aréchaga-Ocampo E., González-De la Rosa C.H., Activation of Akt pathway by transcription-independent mechanisms of retinoic acid promotes survival and invasion in lung cancer cells. // *Mol. Cancer.* 2013. V. 12. P. 44.
29. Ge B., Gram H., Padova F. Di, Huang B., New L., Ulevitch R.J., Luo Y., Han J., MAPKK-independent activation of p38alpha mediated by TAB1-dependent autophosphorylation of p38alpha. // *Science.* 2002. V. 295. P. 1291–1294.
30. Gianni M., Parrella E., Raska I.J., Gaillard E., Nigro E.A., Gaudon C., Garattini E., Rochette-Egly C., P38MAPK-dependent phosphorylation and degradation of SRC-3/AIB1 and RARalpha-mediated transcription. // *EMBO J.* 2006. V. 25. P. 739–751.

31. Gupta D., Shah H.P., Malu K., Berliner N., Gaines P., Differentiation and Characterization of Myeloid Cells // *Curr. Protoc. Immunol.* 2014. V. 104. P. 22F.5.1-22F.5.28.
32. Fontaine J.-F., Mirebeau-Prunier D., Raharijaona M., Franc B., Triau S., Rodien P., Goëau-Brissonnière O., Karayan-Tapon L., Mello M., Houlgatte R., Malthiery Y., Savagner F., Increasing the Number of Thyroid Lesions Classes in Microarray Analysis Improves the Relevance of Diagnostic Markers. // *PLoS One*, 2009. V. 4. P. e7632.
33. Hawthorn L., Stein L., Varma R., Wiseman S., Loree T., Tan D., TIMP1 and SERPIN-A overexpression and TFF3 and CRABP1 underexpression as biomarkers for papillary thyroid carcinoma. // *Head Neck*. 2004. V. 26. P. 1069–1083.
34. Hemmings B.A., Restuccia D.F., PI3K-PKB/Akt pathway. // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2012. V. 4. P. a011189.
35. Henion P.D., Weston J.A., Retinoic acid selectively promotes the survival and proliferation of neurogenic precursors in cultured neural crest cell populations. // *Dev. Biol.* 1994. V. 161. P. 243–50.
36. Heyman R.A., Mangelsdorf D.J., Dyck J.A., Stein R.B., Eichele G., Evans R.M., Thaller C., 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor // *Cell*. 1992. V. 68. P. 397–406.
37. Hoyos B., Imam A., Korichneva I., Levi E., Chua R., Hammerling U., Activation of c-Raf kinase by ultraviolet light. Regulation by retinoids // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 23949—23957.
38. Hsu S.L., Wu W.S., Tyan Y.S., Chou C.K., Retinoic acid-induced apoptosis is prevented by serum albumin and enhanced by Lipiodol in human hepatoma Hep3B

cells. // *Cancer Lett.* 1998. V. 129. P. 205–214.

39. Hsu S.L., Hsu J.W., Liu M.C., Chen L.Y., Chang C.D., Retinoic acid-mediated G1 arrest is associated with induction of p27(Kip1) and inhibition of cyclin-dependent kinase 3 in human lung squamous carcinoma CH27 cells. // *Exp. Cell Res.* 2000. V. 258. P. 322–331.

40. Huang Y., de la Chapelle A., Pellegata N.S., Hypermethylation, but not LOH, is associated with the low expression of MT1G and CRABP1 in papillary thyroid carcinoma. // *Int. J. cancer.* 2003. V. 104, P. 735–744.

41. Huo L., Cui D., Yang X., Gao Z., Trier K., Zeng J., All-trans retinoic acid modulates mitogen-activated protein kinase pathway activation in human scleral fibroblasts through retinoic acid receptor beta. // *Mol. Vis.* 2013. V. 19. P. 1795–1803.

42. Iwata M., Hirakiyama A., Eshima Y., Kagechika H., Kato C., Song S.Y., Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells // *Immunity.* 2004. V. 21. P. 527–538.

43. Janknecht R., Hunter T., Convergence of MAP kinase pathways on the ternary complex factor Sap-1a // *EMBO J.* 1997. V. 16. P. 1620–1627

44. Kane M.A., Folias A.E., Pingitore A., Perri M., Obrochta K.M., Krois C.R., Cione E., Ryu J.Y., Napoli J.L., Identification of 9-cis-retinoic acid as a pancreas-specific autacoid that attenuates glucose-stimulated insulin secretion. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010. V. 107. P. 21884–21889.

45. Kang S., Duell E.A., Fisher G.J., Datta S.C., Wang Z.Q., Reddy A.P., Tavakkol A., Yi J.Y., Griffiths C.E.M., Elder J.T., Voorhees J.J., Application of retinol to human skin in vivo induces epidermal hyperplasia and cellular retinoid

binding proteins characteristic of retinoic acid but without measurable retinoic acid levels or irritation // *J. Invest. Dermatol.* 1995. V. 105. P. 549–556.

46. Kedishvili N.Y., Enzymology of retinoic acid biosynthesis and degradation. // *J. Lipid Res.* 2013. V. 54. P. 1744–1760.

47. Lee H.S., Kim B.-H., Cho N.-Y., Yoo E.J., Choi M., Shin S.-H., Jang J.-J., Suh K.-S., Kim Y.S., Kang G.H., Prognostic implications of and relationship between CpG island hypermethylation and repetitive DNA hypomethylation in hepatocellular carcinoma. // *Clin. Cancer Res.* 2009. V. 15, P. 812–820.

48. Lind G.E., Kleivi K., Meling G.I., Teixeira M.R., Thiis-Evensen E., Rognum T.O., Lothe R.A., ADAMTS1, CRABP1, and NR3C1 identified as epigenetically deregulated genes in colorectal tumorigenesis. // *Cell. Oncol.* 2006. V. 28. P. 259–272.

49. Liu J., Mao W., Ding B., Liang C., ERKs/p53 signal transduction pathway is involved in doxorubicin-induced apoptosis in H9c2 cells and cardiomyocytes. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2008. V. 295. P. H1956-65.

50. Lopez-Carballo G., Moreno L., Masia S., Perez P., Baretino D., Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway by retinoic acid is required for neural differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 25297–25304.

51. Manning B.D., Cantley L.C., AKT/PKB signaling: navigating downstream. // *Cell.* 2007. V. 129. P. 1261–1274.

52. Masiá S., Baretino D., Lera A.R. de, Alvarez S., Rapid, Nongenomic Actions of Retinoic Acid on Phosphatidylinositol-3-Kinase Signaling Pathway Mediated by the Retinoic Acid Receptor // *Mol. Endocrinol.* 2007. V. 21. P. 2391–2402.

53. Mayo L.D., Donner D.B., A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001. V. 98. P. 11598–11603.
54. McCubrey J.A., Steelman L.S., Bertrand F.E., Davis N.M., Sokolosky M., Abrams S.L., Montalto G., D'Assoro A.B., Libra M., Nicoletti F., Maestro R., Basecke J., Rakus D., Gizak A., Demidenko Z.N., Cocco L., Martelli A.M., Cervello M., GSK-3 as potential target for therapeutic intervention in cancer. // *Oncotarget.* 2014. V. 5. P. 2881–2911.
55. Meyskens F.L.J., Salmon S.E., Inhibition of human melanoma colony formation by retinoids. // *Cancer Res.* 1979. V. 39. P. 4055–4057.
56. Orton R.J., Sturm O.E., Vyshemirsky V., Calder M., Gilbert D.R., Kolch W., Computational modelling of the receptor-tyrosine-kinase-activated MAPK pathway. // *Biochem. J.* 2005. V. 392. P. 249–261.
57. Papassava P., Gorgoulis V.G., Papaevangelidou D., Vlahopoulos S., Dam H. van, Zoumpourlis V., Overexpression of Activating Transcription Factor-2 Is Required for Tumor Growth and Progression in Mouse Skin Tumors // *Cancer Res.* 2004. V. 64. P. 8573–8584.
58. Persaud S.D., Lin Y.W., Wu C.Y., Kagechika H., Wei L.N., Cellular retinoic acid binding protein I mediates rapid non-canonical activation of ERK1/2 by all-trans retinoic acid // *Cell. Signal.* 2013. V. 25. P. 19–25.
59. Persaud S.D., Park S.W., Ishigami-Yuasa M., Koyano-Nakagawa N., Kagechika H., Wei L.-N., All trans-retinoic acid analogs promote cancer cell apoptosis through non-genomic Crabp1 mediating ERK1/2 phosphorylation. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 22396.

60. Persons D.L., Yazlovitskaya E.M., Pelling J.C., Effect of extracellular signal-regulated kinase on p53 accumulation in response to cisplatin. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. P. 35778–35785.
61. Piskunov A., Rochette-Egly C., A retinoic acid receptor RARalpha pool present in membrane lipid rafts forms complexes with G protein alphaQ to activate p38MAPK. // *Oncogene.* 2012. V. 31. P. 3333–3345.
62. Piu F., Gauthier N.K., Wang F., Beta-arrestin 2 modulates the activity of nuclear receptor RAR beta2 through activation of ERK2 kinase. // *Oncogene.* 2006. V. 25. P. 218–229.
63. Quintero Barceinas R.S., Garcia-Regalado A., Arechaga-Ocampo E., Villegas-Sepulveda N., Gonzalez-De la Rosa C.H., All-Trans Retinoic Acid Induces Proliferation, Survival, and Migration in A549 Lung Cancer Cells by Activating the ERK Signaling Pathway through a Transcription-Independent Mechanism. // *Biomed Res. Int.* 2015. V. 2015. P. 404368.
64. Raffo P., Emionite L., Colucci L., Belmondo F., Moro M.G., Bollag W., Toma S., Retinoid receptors: Pathways of proliferation inhibition and apoptosis induction in breast cancer cell lines // *Anticancer Res.* 2000. V. 20. P. 1535–1543.
65. Ray W.J., Bain G., Yao M., Gottlieb D.I., CYP26, a novel mammalian cytochrome P450, is induced by retinoic acid and defines a new family. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. P. 18702–18708.
66. Santarpia L., Lippman S.M., El-Naggar A.K., Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy. // *Expert Opin. Ther. Targets.* 2012. V. 16. P. 103–119.
67. Sauvant P., Cansell M., Atgie C., Vitamin A and lipid metabolism:

relationship between hepatic stellate cells (HSCs) and adipocytes. // *J. Physiol. Biochem.* 2011. V. 67. P. 487–496.

68. Schug T.T., Berry D.C., Shaw N.S., Travis S.N., Noy N., Opposing effects of retinoic acid on cell growth result from alternate activation of two different nuclear receptors. // *Cell.* 2007. V. 129. P. 723–33.

69. Serra V., Scaltriti M., Prudkin L., Eichhorn P.J.A., Ibrahim Y.H., Chandarlapaty S., Markman B., Rodriguez O., Guzman M., Rodriguez S., Gili M., Russillo M., Parra J.L., Singh S., Arribas J., Rosen N., Baselga J., PI3K inhibition results in enhanced HER signaling and acquired ERK dependency in HER2-overexpressing breast cancer. // *Oncogene.* 2011. V. 30. P. 2547–2557.

70. Shaw N., Elholm M., Noy N., Retinoic Acid is a High Affinity Selective Ligand for the Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\beta/\delta$  // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 41589–41592.

71. Song G., Ouyang G., Bao S., The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. // *J. Cell. Mol. Med.* 2005. V. 9. P. 59–71.

72. Stevison F., Jing J., Tripathy S., Isoherranen N., Role of Retinoic Acid-Metabolizing Cytochrome P450s, CYP26, in Inflammation and Cancer. // *Adv. Pharmacol.* 2015. V. 74. P. 373–412.

73. Tanaka K., Imoto I., Inoue J., Kozaki K., Tsuda H., Shimada Y., Aiko S., Yoshizumi Y., Iwai T., Kawano T., Inazawa J., Frequent methylation-associated silencing of a candidate tumor-suppressor, CRABP1, in esophageal squamous-cell carcinoma. // *Oncogene.* 2007. V. 26. P. 6456.

74. Yan Y., Li Z., Xu X., Chen C., Wei W., Fan M., Chen X., Li J.J., Wang Y., Huang J., All-trans retinoic acids induce differentiation and sensitize a

radioresistant breast cancer cells to chemotherapy. // BMC Complement. Altern. Med. 2016. V. 16. P. 113.

75. Zarubin T., Han J., Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. // Cell Res. 2005. V. 15. P. 11–18.

76. Zhao M., New L., Kravchenko V. V, Kato Y., Gram H., Padova F. di, Olson E.N., Ulevitch R.J., Han J., Regulation of the MEF2 family of transcription factors by p38. // Mol. Cell. Biol. 1999. V. 19. P. 21–30.