

# Некоторые новые аспекты исследований множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток

А.А. Ставровская<sup>1</sup>, Г.П. Генс<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва;

<sup>2</sup>кафедра онкологии и лучевой терапии ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России

Контакты: Алла Александровна Ставровская [astavrovskaya@yahoo.com](mailto:astavrovskaya@yahoo.com)

Множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) опухолевых клеток — резистентность клетки одновременно к большому количеству веществ, разных по химическому строению и механизму действия. Одним из важнейших и наиболее исследованных механизмов МЛУ является активность транспортных белков семейства ABC (ABC-транспортёры). ABC-транспортёры, выводящие токсические соединения из клеток, и гены, кодирующие ABC-транспортёры, содержатся во всех живых клетках. В обзоре рассматриваются работы, посвященные исследованию трехмерной структуры ABC-транспортёров; результаты, полученные при изучении эволюции МЛУ, определяемой ABC-транспортёрами, а также некоторые молекулярные механизмы, которые могут определять эволюцию МЛУ.

**Ключевые слова:** множественная лекарственная устойчивость, ABC-транспортёры, стволовые клетки опухоли, эпителиально-мезенхимальный переход, белок YB-1

## Multidrug resistance of tumor cells: some new trends in research

A.A. Stavrovskaya<sup>1</sup>, G.P. Guens<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Federal State Budgetary Institution “N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center”, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow;

<sup>2</sup>Department of Oncology and Radiology, Evdokimov State University of Medicine and Dentistry, Moscow

Multidrug resistance (MDR) of tumor cells is the resistance to a broad spectrum of structurally unrelated cytotoxic drugs with different mechanisms of action. One of the main causes of MDR phenotype is the activity of ATP-binding cassette transporters (ABC transporters). ABC transporters efflux toxic compounds from the cells. All living cells contain ABC transporters. This review is dedicated to the studies of three-dimensional structure of ABC transporters, to the data concerning MDR evolution in tumor cell populations. Some information about molecular mechanisms of MDR evolution is also presented.

**Key words:** multidrug resistance, ABC-transporters, tumor stem cells, epithelial-mesenchymal transition, YB-1 protein

### 1. Введение

Под множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) понимают резистентность клеток одновременно к большому количеству веществ, разных по химическому строению и механизму действия на клетку. МЛУ является существенной помехой на пути успешной терапии злокачественных новообразований и инфекционных болезней. В последние годы стало ясно, что в основе развития МЛУ в клеточных популяциях нередко лежат несколько молекулярных механизмов, т. е. что МЛУ является многофакторным феноменом. Это обстоятельство затрудняет поиски агентов, преодолевающих МЛУ. Важнейшая задача исследований МЛУ — установление связей между разными молекулярными механизмами, определяющими лекарственную устойчивость, и поиски путей ее преодоления.

Одним из важнейших и наиболее исследованных механизмов МЛУ является активность транспортных белков семейства ABC (далее ABC-транспортёры). ABC-транспортёры, выводящие токсические соединения из клеток, и гены, кодирующие ABC-транспортёры, содержатся во всех живых клетках. Поэтому, не-

сомненно, чрезвычайно важно понимать, как работают эти «выбрасыватели» разнообразных веществ. Достижениям в этой области посвящен раздел 2 данной статьи.

В последние годы новые весьма значимые результаты получены в работах, посвященных изучению эволюции МЛУ, определяемой ABC-транспортёрами. Эти исследования описаны в разделе 3. И последний раздел — раздел 4 — посвящен некоторым молекулярным механизмам, которые могут определять эволюцию МЛУ.

### 2. Структура ABC-транспортёров

Говоря о структурной организации транспортных белков, с активностью которых связана МЛУ клетки, в первую очередь необходимо упомянуть замечательного исследователя А.А. Нейфаха мл., внесшего большой вклад в решение данной проблемы [1]. Ему и его соавторам удалось выяснить, какая структура белков позволяет им связывать и перемещать через мембраны необычайно большое количество разнообразных веществ. Долгое время вызывало удивление исследователей большое количество разнообразных субстратов, которые могут связывать такие мультилекарственные

транспортёры (МЛТ), как Р-гликопротеин (Pgp, он же по новой номенклатуре ABCB1). Было показано, например, что Pgp транспортирует сотни лекарств, пептидов и некоторые липиды [2]. Классические исследования большого числа ферментов показали, что связывание фермента с субстратом осуществляется благодаря ряду специфических атомарных взаимодействий между аминокислотными остатками фермента и молекулой субстрата. Неудивительно, что сама мысль о том, что связывающий сайт МЛТ может взаимодействовать с десятками не сходных по структуре молекул, воспринималась многими как нарушение основных законов биохимии [3]. Проблемы с очисткой и кристаллизацией белков клеточной мембраны сильно затрудняли исследования в этом направлении. А.А. Нейфах и соавторы провели исследование растворимого белка BmrR, близкого к МЛТ [4]. BmrR – регулятор транскрипции Bmr, мультилекарственного транспортера *B. subtilis*. В ответ на связывание различных гидрофобных катионов он активирует экспрессию Bmr. Важно подчеркнуть, что была проанализирована структура BmrR не только в покое, но и в комплексах с субстратами. Результаты всех этих работ позволили построить модель перемещения ABC-транспортерами своих субстратов [3, 4].

Известно, что Pgp включает в себя два TMD (трансмембранных домена) и два NBD (АТФ-связывающих домена). Структурный анализ выявил внутри клеточной мембраны большую полость (карман), сформированную трансмембранными спиралями молекулы транспортера BmrR [4]. Этот карман имел два боковых отверстия, обращенных внутрь пространства мембраны, через которые, по-видимому, субстраты могли бы войти в полость кармана. Ранее полученные данные свидетельствовали в пользу того, что субстраты выбрасываются транспортерами из пространства, ограниченного внутренним слоем мембраны, а не из цитозоля [1, 3]. Согласно предложенной модели, после связывания АТФ с внутриклеточными NBD транспортера, конформация трансмембранных спиралей белка сильно изменяется, в результате чего боковые отверстия закрываются [3, 4]. Этот процесс сопровождается, очевидно, снижением аффинности транспортера к субстрату, что приводит к диссоциации связанного субстрата во внеклеточную среду. Вслед за гидролизом АТФ и диссоциацией ADP и фосфата молекула транспортера возвращается к исходной конформации, характеризующейся высокой аффинностью к субстратам. Механизм связывания субстрата, как полагают, состоит в следующем: лиганды, проникающие в глубокий карман белка, устанавливают ван-дер-ваальсовы связи с окружающими гидрофобными остатками. Существенно, что размеры связывающего кармана должны быть достаточно велики для того, чтобы разные лигандные молекулы могли ориентироваться по-разному для взаимодействия с разными наборами остатков, формирующих стенки кармана [3].

Поскольку структуры ABC-транспортеров млекопитающих в состоянии их связи с субстратами исследованы не были, эта модель пока носила в отношении них гипотетический характер, и исследования в этом направлении требовали продолжения [1]. Тем не менее основные механизмы связывания субстратов ABC-транспортерами и сходными с ними белками после исследований А.А. Нейфаха стали ясными.

В 2009 г. были опубликованы результаты рентгеновского анализа кристаллизованного мышинового Pgp при разрешении 3.8–4.4 Å [5]. Белок был исследован как в состоянии связи с субстратами, так и без этой связи. Была обнаружена очень большая полость (6000 Å<sup>3</sup>), ограниченная трансмембранными доменами белка. Размер полости обеспечивает присутствие в ней по меньшей мере двух молекул субстратов одновременно. Полость расположена внутри клеточной мембраны и открыта в сторону внутреннего листка некими «порталами» [5]. Это так называемая «смотрящая внутрь» (inward-facing) конформация Pgp. Существует и «смотрящая наружу» конформация, которая пока детально не изучена. Конформация inward-facing рассматривается как начальная, необходимая для связывания субстрата. Впоследствии было показано, что обращенный внутрь Pgp чрезвычайно изменчив и претерпевает неожиданно много конформационных изменений [6].

Среди других работ последних лет, посвященных изучению структуры ABC-транспортеров, стоит упомянуть исследование роли остатков пролина, расположенных на границе трансмембранных доменов белка ABCG2 (BCRP) [7]. В данной работе получены факты, свидетельствующие в пользу того, что Pro392 важен для активности ABCG2 в качестве транспортера, а Pro485 в третьем трансмембранном домене может быть значим для узнавания транспортером определенных субстратов. Таким образом, начали появляться сведения относительно механизмов регуляции функциональной активности ABC-транспортеров.

### 3. Эволюция множественной лекарственной устойчивости

В последние годы серьезный прогресс наметился в исследовании проблемы эволюции развития МЛУ в популяциях опухолевых клеток. Было замечено, что при лечении больных лекарственными препаратами может нарастать количество клеток, характеризующихся признаками стволовых клеток опухоли (СКО). Так, было обнаружено, что после неoadъювантной химиотерапии в опухолях молочной железы (РМЖ) нарастает количество клеток с фенотипом CD44+/CD24– (характерное для СКО РМЖ сочетание маркеров). Это происходило достаточно быстро – примерно через 12 недель лечения [8]. Повышалась способность клеток РМЖ формировать маммосферы, возрастала степень их опухолеродности при подкожном введении клеток экспериментальным животным [8].

При исследовании больных хроническим миелолейкозом (ХМЛ) нами были обнаружены достоверные различия в выживаемости пациентов в зависимости от наличия или отсутствия выброса Родамина 123 (Rhl23) клетками крови и костного мозга. Хорошо известно, что о функциональной активности Pgp чаще всего судят по скорости выведения клетками Rhl23, являющегося субстратом Pgp. Таким образом, выживаемость больных была связана с наличием в лейкозных клетках функционально активного Pgp. Мы получили также данные, свидетельствующие о том, что при лечении иматинибом происходит отбор стволовых лейкозных клеток, характеризующихся фенотипом CD34+/CD38- и экспрессией Pgp и других транспортеров семейства ABC [9]. Все эти данные показывают, что разные препараты могут способствовать накоплению СКО в разных новообразованиях. Однако, очевидно, есть и лекарственные средства, при терапии которыми накопление СКО не наблюдается [8].

Результаты, полученные при исследованиях клинического материала, были блестяще развиты в экспериментальных исследованиях. В работе А.М. Calgagno et al. [10] было показано, что клетки РМЖ человека линии MCF-7, выжившие после длительного воздействия доксорубина, приобретают лекарственную устойчивость (клетки MCF-7/ADR). Длительная лекарственная селекция способствует появлению клеток, имеющих такой же фенотип, как и стволовые клетки РМЖ, — CD44+/CD24- [10]. Клетки MCF-7/ADR более инвазивны *in vitro* (в камерах Бойдена, покрытых матригелем), чем родительская линия, обладают способностью формировать маммосферы и более опухолеродны при прививке мышам, что характерно для СКО. В этом же исследовании показано, что клетки с фенотипом CD44+/CD24-, очевидно, обладают повышенной выживаемостью за счет активации некоторых сигнальных путей, включая сигнальный путь NF-κB [10]. Нужно подчеркнуть, что авторы показали, что приобретение клетками признаков СКО не связано непосредственно с повышением экспрессии Pgp: клетки, в которые был трансфицирован ген *MDR1*, кодирующий Pgp, приобрели МЛУ, но не фенотип СКО. Очевидно, для накопления СКО необходимо продолжительное воздействие лекарства на популяцию малигнизированных клеток.

В опытах Л.А. Панишевой (лаборатория генетики опухолевых клеток РОНЦ) было показано, что при продолжительном воздействии бортезомиба (9 нед) на популяцию клеток линии K562/i-S9 (клетки ХМЛ с повышенной экспрессией Pgp) в популяции накапливаются варианты с активированной киназой Akt. В этих клетках наблюдается также повышенная экспрессия Pgp и маркера стволовых кровяных клеток CD34, т.е. накапливаются варианты с фенотипом стволовых кровяных клеток. Этого эффекта не наблюдалось в популяции нерезистентных клеток K562, которые также обрабатывали бортезомибом в течение 9 нед [11]. Таким образом, бортезомиб может способствовать на-

коплению в малигнизированной лекарственно-устойчивой популяции вариантов, за счет которых опухоль может прогрессировать. В таких вариантах активирован не один, а по меньшей мере два (или больше) молекулярных механизма, способствующих выживанию клеток в неблагоприятных условиях. Можно полагать, что эти процессы происходят быстрее в популяции резистентных клеток. Причины этого предстоит выяснить.

В основе более высокой выживаемости резистентных клеток при продолжительном воздействии на них химиотерапевтических препаратов может лежать возникновение иных (в дополнение к гиперэкспрессии ABC-транспортеров) механизмов лекарственной устойчивости. Так, например, в клетках KB 8-5 (резистентных за счет повышенной экспрессии Pgp) бортезомиб увеличивал количество фосфорилированной формы киназы Akt. При сравнении резистентных (KB 8-5) и чувствительных (KB 3-1) клеток этот эффект обнаружен только в резистентном варианте. Это свидетельствует о том, что под влиянием бортезомиба изменения сигнальных путей, вовлеченных в регуляцию пролиферации, могут происходить в первую очередь в лекарственно-устойчивых клетках с гиперэкспрессией ABC-транспортеров [12].

Повышение лекарственной устойчивости опухолей может сопутствовать некоторым этапам эволюции новообразования: приобретению инвазивных свойств и эпителиально-мезенхимальному переходу (ЭМП) и/или накоплению в популяции стволовых клеток. Так, для опухолей молочной железы человека показано, что именно в инвазивных клеточных линиях (в отличие от неинвазивных или иммортализованных) под влиянием химиопрепаратов повышалась экспрессия сразу нескольких ABC-транспортеров [13]. Существенно при этом, что возрастало количество мРНК разных ABC-транспортеров (авторы исследовали 16 генов, имеющих отношение к МЛУ). ЭМП в иммортализованных или неинвазивных культурах клеток РМЖ повышал степень экспрессии ABC-транспортеров, способность клеток к миграции и инвазии. Реверсия ЭМП, вызванная подавлением активности факторов транскрипции, регулирующих этот процесс, снижала количество мРНК ABC-транспортеров и способность клеток к инвазии [13]. Эти авторы показали также, что промоторные области генов ABC-транспортеров содержат области связывания для факторов транскрипции, индуцирующих ЭМП, и что гиперэкспрессия Twist, Snail и FOXC2 активирует гены транспортных белков семейства ABC [13]. Эти результаты свидетельствуют о связи эпителио-мезенхимальной пластичности и экспрессии ABC-транспортеров. Они выявляют некоторые из механизмов этой связи. В дальнейшем эти данные были подтверждены и расширены [14].

СКО, о которых мы уже говорили в начале данного раздела, устойчивы к терапии и могут инициировать рост новообразований, нередко через годы после полной клинической ремиссии. Проблеме СКО посвяще-

но большое количество экспериментальных исследований и обзорных статей последнего времени (см., например, [15–17]). Здесь мы разберем лишь проблему связи СКО и транспортных белков семейства ABC. Существенным для биологии стволовых клеток открытием послужили работы, показавшие, что нормальные стволовые клетки гиперэкспрессируют некоторые ABC-транспортёры (в первую очередь ABCB1 и/или ABCG2) [18–20]. СКО также гиперэкспрессируют транспортёры семейства ABC [21]. Экспрессия транспортёров стволовыми клетками зависит от ткани. Выделяются гемопоэтические нормальные и опухолевые стволовые клетки (ГСК), которые экспрессируют одновременно большое количество разных ABC-транспортёров [22–24]. Этот профиль экспрессии отличает ГСК от стволовых клеток других новообразований.

Среди маркеров стволовых клеток солидных новообразований важное место принадлежит транспортёрам ABCB1, ABCB5 и ABCG2. Поскольку ABCB1 (Pgp) и ABCG2 (BCRP) исследуются давно и неоднократно подробно описаны (см., например, [25–27] и др.), здесь мы подробнее остановимся на белке ABCB5. Его роль в СКО и МЛУ была описана позже, чем для двух других транспортёров. ABCB5 входит в то же подсемейство В, что и ABCB1 (Pgp) и гомологичен ему на 73 % [28]. Так же как Pgp, он выбрасывает Родамин 123 и доксорубин из клеток [29, 30]. ABCB5 влияет на электрический потенциал клеточной мембраны и способствует слиянию клеток [28]. Было показано, что ABCB5 является маркером стволовых клеток меланом, способных как к самообновлению, так и к дифференцировке [30]. ABCB5 экспрессируется также СКО гепатом и маркирует лекарственно-устойчивые клетки раков кишечника [31, 32].

Какие же свойства сообщают стволовым клеткам экспрессируемые ими ABC-транспортёры? Нокаут генов *ABCG2* и/или *ABCB1* у мышей приводил к рождению вполне жизнеспособных и фертильных животных с нормальным компартментом стволовых клеток [33, 34]. Таким образом, эти гены не являются абсолютно необходимыми для существования стволовых клеток. Однако нокаутные мыши оказались высокочувствительными к некоторым химиопрепаратам. Все это позволило считать, что ABC-транспортёры выполняют функции защиты стволовых клеток и не имеют отношения к их поддержанию [21]. Однако данные самого последнего времени свидетельствуют о том, что по крайней мере один транспортёр, ABCG2, вовлечен в контроль клеточного цикла стволовых клеток/клеток-предшественников сердечной мышцы (СКСМ) [35]. Было проведено сравнение СКСМ мышей с нокаутом гена *ABCG2* и тех же клеток мышей дикого типа. Оказалось, что нокаут *ABCG2* приводит к накоплению СКСМ в стадии G1, т.е. что у нокаутных мышей нарушен переход G1-S [35]. Кроме того, исследователи нашли, что нокаут *ABCG2* влияет на переход от симметричного к асимметричному делению [35]. Таким

образом, нельзя исключить, что ABCG2 (BCRP) участвует в регуляции «стволового» фенотипа клеток.

#### 4. Регуляция ABC-транспортёров. Белок YB-1

Регуляция активности ABC-транспортёров сложна (см. обзоры [36, 37]). Так, в регуляцию ABCB1 (Pgp) вовлечены MAP-киназы, JNK, p38, цАМФ, PI3K, PKC, сигнальный путь, контролируемый ретиноидами, сфингомиелиновый путь и др. [36, 37]. Мы остановимся на последних данных относительно участия белка YB-1 в регуляции ABC-транспортёров. Многофункциональный белок YB-1 взаимодействует с РНК, ДНК и белками и участвует в регуляции многих жизненно важных процессов клетки как на уровне транскрипции, так и на уровне трансляции. Он влияет также на репарацию ДНК [38]. YB-1 принадлежит к группе факторов транскрипции, связывающихся с инвертированным У боксом (последовательностью ССААТ). Было показано, что локализация YB-1 в ядрах опухолевых клеток карцином молочной железы, остеосарком, мелко-клеточных раков легких коррелирует с повышенной экспрессией гена *ABCB1*, кодирующего ABCB1 (Pgp) [39–43]. Введение гена *YB-1* в клетки линии HBL-100 (трансформированные клетки молочной железы) привело к повышению экспрессии YB-1, гиперэкспрессии Pgp и возникновению МЛУ [39]. Было также показано, что YB-1 повышает активность генов *MRP1 (ABCC1)* и *LRP/MVP*, а также снижает экспрессию *MRP2 (ABCC2)* [44–46]. Таким образом, исследования первых лет свидетельствовали в пользу того, что ядерная локализация YB-1 может служить фактором прогноза МЛУ, связанной с активностью ABC-транспортёров [47]. Однако, несмотря на интенсивные исследования в данной области, тест на ядерную локализацию YB-1 в качестве маркера МЛУ не вошел в обиход клинических исследований. Это связано прежде всего с тем, что количество клеток с YB-1 в ядрах в высокой степени зависит от используемых антител к YB-1 и значительно варьирует от исследования к исследованию [48]. Это объясняется доступностью эпитопов белка для антител, поскольку белок может находиться в комплексах. В некоторых работах в опухолях количество клеток с ядерным YB-1 было очень мало, и это не позволяло сделать какие-либо выводы. Мы применили антитела к YB-1, которые выявляли ядерную локализацию YB-1 в 27 % случаев РМЖ [49]. В тех же образцах опухолей определяли количество мРНК *YB-1*. Мы нашли, что количество мРНК *YB-1* может служить фактором прогноза возникновения отдаленных метастазов [48]. Ядерная локализация YB-1 также коррелировала с повышенным количеством отдаленных метастазов, однако степень корреляции была ниже, чем для содержания мРНК *YB-1* и отдаленных метастазов. При этом мы не нашли корреляции между ядерной локализацией YB-1 и количеством мРНК *YB-1*. Таким образом, эти два параметра могут рассматриваться как независимые признаки. Стало ясным также, что ядерная локализа-

ция YB-1 – не стабильный признак. Так, мы показали, что число случаев РМЖ с ядерной локализацией нарастает после нео-адьювантной терапии [49]. Количество мРНК *YB-1* представляется нам более надежным и стабильным фактором прогноза РМЖ. Также мы показали, что практически во всех случаях РМЖ (препараты, взятые при мастэктомии), в которых была повышена экспрессия ABC-транспортеров, YB-1 имел цитоплазматическую локализацию.

В настоящее время регуляция некоторых ABC-транспортеров трансфактором YB-1 не вызывает сомнений, однако в регуляции МЛУ могут принимать участие разные активности многофункционального белка YB-1. YB-1 участвует в регуляции практически всех основных признаков малигнизации [50]. Поскольку он принимает участие в основных жизненно важных процессах клетки, его активность может определять многофакторную МЛУ (лекарственную устойчивость, определяемую несколькими разными факторами, повышающими выживаемость клеток). В высокой степени прогностический тест с использованием YB-1 оказывается тестом не только на МЛУ, но и на агрессивность течения заболевания. С этой точки зрения стоит упомянуть наши данные, показывающие, что высокие количества мРНК *YB-1* в малых опухолях молочной железы (T1–T2) позволяют выделить группу риска раннего возникновения метастазов этих новообразований, которые обычно считаются наименее агрессивными [49, 51].

Недавно была открыта новая активность белка YB-1 – его способность выполнять функции внеклеточного митогена и фактора, стимулирующего движение клеток [52, 53]. На модели мезангиопролиферативного нефрита крыс было показано, что белок активно секретируется мезангиальными клетками и моноцитами в среду, играя роль экстраклеточного митогена. Помимо увеличения пролиферации, YB-1 усиливал миграцию мезангиальных клеток. Далее было установлено, что вероятным рецептором для секретируемого YB-1 является белок Notch-3. Используя культивируемые линии малигнизированных клеток молочной железы, нам удалось показать, что внеклеточный YB-1 стимулирует пролиферацию и миграцию этих клеток, но не влияет на чувствительность клеток к химиопрепаратам [54]. Возможно, внеклеточный YB-1 может осуществлять свои функции в метастатической нише. Однако для доказательства этого предположения требуются дополнительные исследования.

### 5. Заключение

В последние годы появились новые результаты относительно трехмерной структуры Р-гликопротеина,

подтверждающие ранее высказанные представления о принципах функционирования ABC-транспортеров. Опубликованы первые данные, показывающие, какие аминокислотные остатки могут быть необходимы для конформационных изменений этих белков. Это не только дает нам новое знание, но и открывает новые пути к воздействиям на ABC-транспортеры.

Интересными и перспективными представляются результаты работ относительно участия ABC-транспортеров в эволюции популяций опухолевых клеток. Показано, что при эволюции МЛУ в популяции резистентных клеток быстрее появляются варианты, в которых активирован дополнительный механизм МЛУ, т.е. клетки с многофакторной МЛУ. Экспрессия ABC-транспортеров тесно связана с ЭМП, а также с фракцией клеток, обеспечивающих поддержание опухоли, – с фракцией СКО. Таким образом, ABC-транспортеры вовлечены в прогрессию опухолей на достаточно поздних ее этапах. Появляются данные, свидетельствующие в пользу того, что ABC-транспортеры не только исполняют защитные функции в СКО, но и могут поддерживать фенотип стволовых клеток. Однако пока роль ABC-транспортеров в СКО остается неясной.

Многофункциональный белок YB-1 принимает участие в регуляции активности ABC-транспортеров как на уровне транскрипции, так и на уровне трансляции. Исследование количества мРНК *YB-1* было предложено нами в качестве теста на МЛУ при РМЖ. Показано, что неоадьювантная терапия способствует перемещению YB-1 в ядра опухолевых клеток. Показано, что группу малых (T1–T2) опухолей молочной железы с высоким содержанием мРНК *YB-1* можно выделить как группу повышенного риска возникновения отдаленных метастазов. Данные последних лет свидетельствуют в пользу того, что повышенное количество мРНК *YB-1* в опухоли при мастэктомии прогнозирует агрессивность течения новообразования. Можно полагать, что повышенное количество мРНК *YB-1* имеет отношение к сочетанной регуляции активности ABC-транспортеров и основных признаков малигнизации, определяющих агрессивность опухоли. Нами исследовано действие внеклеточного YB-1 на культивируемые малигнизированные клетки молочной железы. Показано, что внеклеточный YB-1 стимулирует размножение и миграцию клеток, но не влияет на их чувствительность к химиопрепаратам. Возможно, внеклеточный YB-1 может осуществлять свои функции в метастатической нише. Однако для доказательства этого предположения требуются дополнительные исследования.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Higgins C.F. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature* 2007;446(7137):749–57.
2. Ambudkar S.V., Dey S., Hrycyna C.A., Ramachandra M., Pastan I., Gottesman M.M. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999;39:361–98.
3. Нейфах А.А. Множественная лекарственная устойчивость: решение проблемы? *Биол мембраны* 2003;20(3):206–12.
4. Zheleznova E.E., Markham P.N., Neyfakh A.A., Brennan R.G. Structural basis of multidrug recognition by BmrR, a transcription activator of a multidrug transporter. *Cell* 1999;9(3):353–62.
5. Aller S.G., Yu J., Ward A. et al. Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science* 2009;323(5922):1679–80.
6. Wen P.C., Verhalen B., Wilkens S. et al. Origin of large flexibility of P-glycoprotein in the inward-facing state. *J Biol Chem* 2013;288(26):19211–20.
7. Ni Z., Bikadi Z., Shuster D.L. et al. Identification of proline residues in or near the transmembrane helices of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) that are important for transport activity and substrate specificity. *Biochemistry* 2011;50(37):8057–66.
8. Li X., Lewis M.T., Huang J. et al. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 2008;100(9):672–9.
9. Стромская Т.П., Рыбалкина Е.Ю., Круглов С.С. и др. Участие Р-гликопротеина в эволюции популяций клеток хронического миелолейкоза при воздействии иматиниба. *Биохимия* 2008;73(1):36–46.
10. Calcagno A.M., Salcido C.D., Gillet J.-P. et al. Prolonged Drug Selection of Breast Cancer Cells and Enrichment of Cancer Stem Cell Characteristics. *J Natl Cancer Inst* 2010;102(21):1637–52.
11. Панищева Л.А. Экспрессия и активность белков множественной лекарственной устойчивости опухолей при воздействии ингибитора протеасом бортезомиба. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2012.
12. Панищева Л.А., Какпакова Е.С., Рыбалкина Е.Ю., Ставровская А.А. Влияние протеасомного ингибитора бортезомиба на экспрессию генов множественной лекарственной устойчивости и активность киназы Akt. *Биохимия* 2011;76(9):1238–47.
13. Saxena M., Stephens M.A., Pathak H., Rangarajan A. Transcription factors that mediate epithelial-mesenchymal transition lead to multidrug resistance by upregulating ABC transporters. *Cell Death Dif* 2011;2:e179.
14. Pinto C.A., Widodo E., Waltham M., Thompson E.W. Breast cancer stem cells and epithelial mesenchymal plasticity – Implications for chemoresistance. *Cancer Lett* 2013. pii: S0304-3835(13)00453-9. doi:10.1016/j.canlet.2013.06.003. [Epub ahead of print].
15. Mani S.A., Guo W., Liao M.J. et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008;13(4):704–15.
16. Clevers H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med* 2011;17(3):313–9.
17. Francipane M.G., Chandler J., Lagasse E. Cancer Stem Cells: A Moving Target. *Curr Pathobiol Rep* 2013;1(2):111–8.
18. Chaudhary P.M., Roninson I.B. Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells. *Cell* 1991;66(1):85–94.
19. Kim M., Turnquist H., Jackson J. et al. The multidrug resistance transporter ABCG2 (breast cancer resistance protein 1) effluxes Hoechst 33342 and is overexpressed in hematopoietic stem cells. *Clin Cancer Res* 2002;8(1):22–8.
20. Scharenberg C.W., Harkey M.A., Torok-Storb B. The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood* 2002;99(2):507–12.
21. Dean M. ABC transporters, drug resistance, and cancer stem cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2009;14(1):3–9.
22. de Grouw E.P., Raaijmakers M.H., Boezeman J.B. et al. Preferential expression of a high number of ATP binding cassette transporters in both normal and leukemic CD34+CD38- cells. *Leukemia* 2006;20(4):750–4.
23. Moitra K., Lou H., Dean M. Multidrug efflux pumps and cancer stem cells: insights into multidrug resistance and therapeutic development. *Clin Pharmacol Ther* 2011;89(4):491–502.
24. Barbet R., Peiffer I., Hutchins J.R. et al. Expression of the 49 human ATP binding cassette (ABC) genes in pluripotent embryonic stem cells and in early- and late-stage multipotent mesenchymal stem cells: possible role of ABC plasma membrane transporters in maintaining human stem cell pluripotency. *Cell Cycle* 2012;11(8):1611–20.
25. Ставровская А.А. Множественная лекарственная устойчивость, обусловленная активностью транспортных белков клетки: новые факты и некоторые перспективы исследований. *Биол мембраны* 2003;20(3):196–205.
26. Мечетнер Е.Б. Новые подходы к оценке экспрессии и функциональной активности Р-гликопротеина. *Биол мембраны* 2003;20(3):213–24.
27. Gottesman M.M. Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu Rev Med* 2002;53:615–27.
28. Frank N.Y., Pendse S.S., Lapchak P.H. et al. Regulation of progenitor cell fusion by ABCB5 P-glycoprotein, a novel human ATP-binding cassette transporter. *J Biol Chem* 2003;278(47):47156–65.
29. Frank N.Y., Margaryan A., Huang Y. et al. BC5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. *Cancer Res* 2005;65(10):4320–33.
30. Schatton T., Murphy G.F., Frank N.Y. et al. Identification of cells initiating human melanomas. *Nature* 2008;451(7176):345–9.
31. Cheung S.T., Cheung P.F., Cheng C.K. et al. Granulin-epithelin precursor and ATP-dependent binding cassette (ABC)B5 regulate liver cancer cell chemoresistance. *Gastroenterology* 2011;140(3):344–55.
32. Wilson B.J., Schatton T., Zhan Q. et al. ABCB5 identifies a therapy-refractory tumor cell population in colorectal cancer patients. *Cancer Res* 2011;71(15):5307–16.
33. Zhou S., Morris J.J., Barnes Y. et al. Bcrp1 gene expression is required for normal numbers of side population stem cells in mice, and confers relative protection to mitoxantrone in hematopoietic cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(19):12339–44.
34. Schinkel A.H., Smit J.J., van Tellingen O. et al. Disruption of the mouse mdr1a P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* 1994;77(4):491–502.
35. Sereti K.I., Oikonomopoulos A., Unno K. et al. ATP-binding cassette G-subfamily transporter 2 regulates cell cycle progression and asymmetric division in mouse cardiac side population progenitor cells. *Circ Res* 2013;112(1):27–34.
36. Ставровская А.А., Стромская Т.П. Транспортные белки семейства ABC и множественная лекарственная устойчивость опухолевых клеток (обзор). *Биохимия* 2008;73(5):735–50.
37. Sui H., Fan Z.Z., Li Q. Signal transduction pathways and transcriptional mechanisms of ABCB1/Pgp-mediated multiple drug resistance in human cancer cells. *J Int Med Res* 2012;40(2):426–35.
38. Елисеєва И.А., Ким Е.Р., Гурьянов С.Г., Овчинников Л.П., Лябин Д.Н. Y-бокс-связывающий белок 1 (YB-1) и его функции. *Биохимия* 2011;13:1402–33.
39. Bargou R.C., Jürchott K., Wagener C. et al. Nuclear localization and increased levels of transcription factor YB-1 in primary human breast cancers are associated with

- intrinsic MDR1 gene expression. *Nat Med* 1997;3(4):447–50.
40. Saji H., Toi M., Saji S. et al. Nuclear expression of YB-1 protein correlates with P-glycoprotein expression in human breast carcinoma. *Cancer Lett* 2003;190(2):191–7.
41. Janz M., Harbeck N., Dettmar P. et al. Y-box factor YB-1 predicts drug resistance and patient outcome in breast cancer independent of clinically relevant tumor biologic factors HER2, uPA and PAI-1. *Int J Cancer* 2002;97(3):278–82.
42. Oda Y., Sakamoto A., Shinohara N. et al. Nuclear expression of YB-1 protein correlates with P-glycoprotein expression in human osteosarcoma. *Clin Cancer Res* 1998;4(9):2273–7.
43. Shibahara K., Sugio K., Osaki T. et al. Nuclear expression of the Y-box binding protein, YB-1, as a novel marker of disease progression in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7(10):3151–5.
44. Stein U., Bergmann S., Scheffer G.L. et al. YB-1 facilitates basal and 5-fluorouracil-inducible expression of the human major vault protein (MVP) gene. *Oncogene* 2005;24(22):3606–18.
45. Geier A., Mertens P.R., Gerloff T. et al. Constitutive rat multidrug-resistance protein 2 gene transcription is down-regulated by Y-box protein 1. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;309(3):612–8.
46. Vaiman A.V., Stromskaya T.P., Rybalkina E.Y. et al. Intracellular localization and content of YB-1 protein in multidrug resistant tumor cells. *Biochemistry (Mosc)* 2006;71(2):146–54.
47. Kuwano M., Oda Y., Izumi H. et al. The role of nuclear Y-box binding protein 1 as a global marker in drug resistance. *Mol Cancer Ther* 2004;3(11):1485–92.
48. Woolley A.G., Algie M., Samuel W. et al. Prognostic association of YB-1 expression in breast cancers: a matter of antibody. *PLoS One* 2011;6(6): e20603.
49. Stavrovskaya A., Stromskaya T., Rybalkina E. et al. YB-1 protein and multidrug resistance of tumor cells. *Current Signal Transduction Therapy* 2012;7(3):237–46.
50. Lasham A., Print C.G., Woolley A.G. et al. YB-1: oncoprotein, prognostic marker and therapeutic target? *Biochem J* 2013;449(1):11–23.
51. Генс Г.П., Моисеева Н.И., Стромская Т.П. и др. Определение количества мРНК гена YB-1 в тканях опухолей молочной железы с целью прогнозирования течения заболевания. *Клиническая и лабораторная диагностика* 2010;2:29–32.
52. Frye B.C., Halfter S., Djurdjaj S. et al. Y-box protein-1 is actively secreted through a non-classical pathway and acts as an extracellular mitogen. *EMBO Rep* 2009;10(7):783–789.
53. Rauen T., Raffetseder U., Frye B.C. et al. YB-1 acts as a ligand for Notch-3 receptors and modulates receptor activation. *J Biol Chem* 2009;284(39):26928–40.
54. Моисеева Н.И., Стромская Т.П., Рыбалкина Е.Ю. и др. Влияние внеклеточного белка YB-1 на культивируемые клетки опухолей молочной железы. *Биол мембраны* 2012;29(5):1–9.