

ЭКСПРЕССИЯ *CRABP1* И *CRABP2* В САРКОМАХ МЯГКИХ ТКАНЕЙ

Е.М. Чевкина, И.А. Фаворская, Я.А. Каинов, Г.Ю. Чемерис, А.В. Комельков, Н.А. Дьякова
ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» РАМН, г. Москва

Ключевые слова: синовиальные саркомы, злокачественные фиброзные гистиоцитомы, липосаркомы, злокачественные шванномы, *CRABP1*, *CRABP2*, ИГХ анализ, ПЦР в реальном времени

Цель работы. Исследование экспрессии мРНК *CRABP1* и *CRABP2* и белка *CRABP1* в саркомах мягких тканей человека.

Материалы и методы. ПЦР в реальном времени, ИГХ анализ.

Результаты. В работе впервые проведен анализ экспрессии мРНК генов *CRABP1* и *CRABP2* методом ПЦР в реальном времени в образцах злокачественных новообразований мягких тканей, включая синовиальные саркомы, злокачественные фиброзные гистиоцитомы, злокачественные шванномы и липосаркомы, а также иммуногистохимический анализ экспрессии белка *CRABP1* в образцах монофазных синовиальных сарком. Повышение уровня мРНК как *CRABP1*, так и *CRABP2* было выявлено исключительно в образцах синовиальных сарком и злокачественных фиброзных гистиоцитом (46% для *CRABP1* и 54% для *CRABP2*). В отличие от синовиальных сарком и злокачественных фиброзных гистиоцитом в липосаркомах и злокачественных шванномах не было отмечено повышения экспрессии ни *CRABP1*, ни *CRABP2*; более того, для 40% данных опухолей было характерно снижение количества мРНК *CRABP1*.

По данным ИГХ, высокий уровень белка *CRABP1* обнаруживается в 100% образцов монофазных синовиальных сарком.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о дифференциальном характере экспрессии белков *CRABP* в злокачественных опухолях мягких тканей в зависимости от гистологического типа. Полученные данные открывают перспективы для дальнейших исследований белка *CRABP1* в качестве потенциального прогностического маркера и мишени для таргетной терапии синовиальных сарком.

Введение

CRABP1 и *CRABP2* (Cellular Retinoic Acid Binding Protein) — это близкородственные белки, основной и единственной известной на сегодняшний день функцией которых является их способность связывать ретиноевую кислоту (РК). Ретиноевая кислота является наиболее активным производным витамина А (ретинола) и играет важную роль в различных биологических процессах. В эмбриогенезе позвоночных РК выполняет функцию морфогена и необходима для нормального пренатального развития [9]. Ретиноевая кислота также способна стимулировать дифференцировку широкого спектра клеток различного гистологического происхождения. Передача сигнала от РК играет важную роль и в процессах канцерогенеза. Многочисленные исследования демонстрируют способность РК стимулировать дифференцировку опухолевых клеток [4]. РК также способна подавлять клеточную пролиферацию [28]. Другим важным свойством РК является стимуляция апоптоза опухолевых клеток

различного происхождения [15, 18]. Кроме того, в ряде экспериментальных систем показано, что РК и ее аналоги вызывают выраженное подавление ангиогенеза [10, 12]. Внутри клеток ретинол и его метаболит ретиноль связываются с различными ретинол-связывающими белками (*CRBP1*, -2, -3), в то время как РК образует комплекс со специфическими белками *CRABP1* и *CRABP2* [6].

Белки *CRABP1* и *CRABP2* — это небольшие (около 15 кДа), высококонсервативные белки, локализующиеся преимущественно в цитоплазме, однако способные проникать в ядро благодаря наличию в своей структуре сигнала ядерной локализации [5]. *CRABP1* также обнаруживается в митохондриях [27] и в перинуклеарном пространстве [16].

CRABP1 и *CRABP2* — сходные по строению белки, у человека гомология их белок-кодирующих нуклеотидных последовательностей составляет 74%. Несмотря на то что функции обоих клеточных белков, связывающих РК, до конца не ясны, роль *CRABP2* изучена лучше. *CRABP2* связывает РК в цитоплазме и транспортирует ее в ядро, где осуществляет передачу белкам-рецепторам РК (retinoic acid receptors, RAR). Эта функция *CRABP2* связана со специфическим доменом данного белка, отсутствующего у *CRABP1* [5]. Таким образом, связывание РК белком

Адрес для корреспонденции

Чевкина Е.М.

E-mail: tchevkina@mail.ru

CRABP2 предохраняет ее от деградации и усиливает передачу сигнала от РК, опосредуя ее клеточные эффекты [26]. Сведения о механизмах функционирования *CRABP1* менее однозначны — различные исследования говорят о двойственной роли этого белка. Ряд работ позволяет судить о схожести его функции с *CRABP2*, так как его повышенная экспрессия в клеточных линиях и тканях экспериментальных животных приводит к усилению действия РК на клетки [31]. В то же время данные других исследований свидетельствуют об активном усилении катаболизма РК в присутствии *CRABP1* [32]. Стимуляция метаболизма РК может снижать уровень клеточной дифференцировки, что является одним из показателей злокачественности клеток в культуре, а также признаком агрессивности опухоли и фактором неблагоприятного прогноза в практике клинической онкологии.

Многочисленные исследования экспрессионных и белковых профилей различных опухолей, ставшие доступными в последние годы, неожиданно выявили частые изменения экспрессии генов *CRABP1* и *CRABP2* в ряде солидных опухолей. При этом отдельные данные указывают на возможность функционирования белка *CRABP1* в качестве опухолевого супрессора, поскольку ряд эпителиальных новообразований человека характеризуется сниженной экспрессией *CRABP1*. Так, при раке почки наблюдается выраженное снижение продукции мРНК и белка *CRABP1* в первичных опухолях по сравнению с нормальными тканями [25]. Активное снижение экспрессии *CRABP1* характерно для папиллярной карциномы щитовидной железы [11]. Для опухолей толстой кишки характерно снижение транскрипции *CRABP1* за счет гиперметилирования промоторной области гена. Важно отметить, что этот процесс имеет четкую корреляцию со степенью злокачественности новообразования: метилирование промотора характерно для 50% карцином и наблюдается только в 11% аденом прямой кишки [1]. Схожая ситуация наблюдается и в отношении опухолей печени — подавление экспрессии *CRABP1* в этом типе новообразований также происходит на эпигенетическом уровне за счет метилирования промоторной области [14]. При плоскоклеточном раке пищевода потеря экспрессии *CRABP1* коррелирует с низкой дифференцировкой опухоли и наличием отдаленных микрометастазов в лимфатических узлах [30]. Снижение экспрессии *CRABP1* является фактором неблагоприятного прогноза для больных светлоклеточным и серозным раком яичника [20].

С другой стороны, в последнее время накопилось множество фактов, которые свидетельствуют в пользу проканцерогенной активности *CRABP1*. Так, для ряда новообразований экспрессия *CRABP1* не только выражено повышается, но и зачастую коррелирует с более злокачественным фенотипом опухолевых

клеток в культуре [3, 8]. Для эндометриоидного рака яичников характерно более чем стократное повышение количества мРНК *CRABP1* по сравнению с условно нормальной тканью [2]. В аденокарциномах эндометрия экспрессия *CRABP1* ассоциирована с высоким уровнем инвазивности, а также низкой степенью дифференцировки клеток опухоли [29]. Экспрессия *CRABP1* является фактором неблагоприятного медицинского прогноза при новообразованиях головного мозга, а для немелкоклеточного рака легкого его экспрессия коррелирует с низким уровнем пятилетней выживаемости больных [17].

Аналогичная противоречивая картина наблюдается и для *CRABP2*. Снижение экспрессии *CRABP2* характерно для ряда новообразований человека, таких как опухоли молочной железы [22], головы и шеи [7] и опухоли предстательной железы [23]. Снижение экспрессии *CRABP2* также ассоциировано с эндометриозом, что подтверждает роль данного белка в регуляции пролиферации эпителиальных клеток [24]. В то же время ряд исследований позволяет говорить о возможной промотирующей функции *CRABP2* в процессах канцерогенеза. Так, повышенная экспрессия *CRABP2* характерна для ретинобластом с выраженными инвазивными свойствами [19], а подавление продукции этого белка селективными ингибиторами приводило к снижению миграционной активности клеток нейробластомы человека IMR-32 [13]. В целом приведенные данные свидетельствуют о двойственной роли *CRABP1* и *CRABP2* в процессах канцерогенеза и поднимают вопрос о факторах и молекулярных механизмах, позволяющих этим белкам производить столь диаметрально противоположные эффекты в канцерогенезе опухолей эпителиального происхождения.

Существенно меньше известно о роли *CRABP1* и *CRABP2* в канцерогенезе мезенхимальных солидных новообразований. На сегодняшний день имеется лишь несколько работ, посвященных изменениям экспрессии *CRABP1* при развитии опухолей мягких тканей (ОПМ). В частности, показано, что при развитии лейомиом матки экспрессия *CRABP1* повышается как на уровне мРНК, так и на уровне белка четырехкратно по сравнению с нормальной тканью [33]. Кроме того, существуют данные, свидетельствующие о высокой экспрессии мРНК *CRABP1* в синовиальных саркомах [21], однако данные о функциональном значении данного изменения и корреляциях между продукцией *CRABP1* и клинико-морфологическими характеристиками данной группы опухолей в литературе отсутствуют. Данные об экспрессии *CRABP2* в саркомах и ОПМ в литературе отсутствуют. Таким образом, вопрос о роли *CRABP1* и *CRABP2* в канцерогенезе опухолей мезенхимального происхождения остается открытым.

В данной работе нами впервые проведен сравнительный анализ экспрессии мРНК генов *CRABP1* и *CRABP2* в образцах сарком мягких тканей человека (синовиальных саркомах (СС), злокачественных фиброгистиоцитомах (ЗФГ), липосаркомах и злокачественных шванномах). Результаты выявили значительные изменения в уровне экспрессии исследуемых генов, которые носят разнонаправленный характер. При этом повышение экспрессии как *CRABP1*, так и *CRABP2* было характерно только для групп синовиальных сарком и ЗФГ. Анализ экспрессии *CRABP1* в образцах монофазных синовиальных сарком методом ИГХ выявил высокий уровень данного белка во всех исследованных случаях.

Методы

Характеристика исследованных опухолевых образцов

В работе проводилось исследование операционного материала от больных с опухолями мезенхимального происхождения, проходивших лечение в НИИ КО РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Для анализа методом ПЦР в реальном времени использовали образцы послеоперационного материала (опухолевой и условно нормальной тканей того же гистогенеза от каждого пациента). Образцы тканей замораживали и хранили в жидком азоте. Иммуногистохимическая (ИГХ) реакция проводилась на ультратонких срезах с парафиновых блоков послеоперационного материала. Весь полученный материал проходил гистологическую верификацию в отделе патологической анатомии опухолей человека НИИ КО РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН и был классифицирован по системе FNCLCC (мезенхимальные опухоли). Группа опухолей мезенхимального происхождения для ПЦР анализа включала в себя 28 образцов. Группа монофазных синовиальных сарком для ИГХ анализа включала 27 образцов.

Выделение РНК из образцов тканей

Образцы опухолевой и условно нормальной ткани, замороженные в жидком азоте, гомогенизировали в 1 мл Trizol-Reagent (Invitrogen). К лизату добавляли 200 мкл хлороформа, затем центрифугировали 15 мин при 12 000 g при +4 °С. Верхнюю водную фазу переносили в новую пробирку и осаждали добавлением равного объема изопропилового спирта с последующим центрифугированием 15 мин при 12 000 g при +4 °С. Осадок РНК промывали 1 мл 70% этилового спирта на DEPC-обработанной воде, подсушивали на воздухе и растворяли в соответствующем объеме DEPC-обработанной деионизированной воды. Концентрации растворов РНК и качество их спектров определяли на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies Inc., США). Далее использовались образцы РНК, для которых соотношение A260/A280 составляло не менее 1,8.

Обратная транскрипция РНК. Получение кДНК

Для получения одноцепочечных кДНК использовали 2 мкг тотальной РНК, предварительно обработанной ДНКазой I (Fermentas), согласно протоколу производителя (1 ед. на 1 мкг РНК). Полученную после обработки РНК смешивали с 80 пмоль gandom9 праймера в общем объеме 25 мкл. Реакционная смесь инкубировалась 2 мин при +70 °С. Затем к смеси на льду добавлялось 25 мкл смеси RT-MIX (Fermentas). Полученная смесь инкубировалась при +37 °С в течение 5 мин. Затем в смесь добавлялось 200 ед. ревертазы М-MuLV (Fermentas). Полученная смесь инкубировалась при +42 °С в течение одного часа, затем проводилась инактивация ревертазы при +70 °С в течение 10 мин. Объем пробы доводился до 200 мкл. Пробы хранились при –20 °С.

ПЦР в реальном времени

Матрицей для ПЦР в реальном времени служила кДНК, полученная из образцов опухолевых и соответствующих условно нормальных тканей. ПЦР в реальном времени проводилась с использованием TaqMan зонда (Синтол) на ПЦР-амплификаторе iCycler IQ5 (Bio-Rad). В качестве флуоресцентной метки использовался краситель FAM, в качестве гасителя флуоресценции – BHQ-1. Реакционная смесь включала: 5 пмоль 5'- и 3'-праймеров, 2,5 пмоль TaqMan зонда, 1,25 mM MgCl₂, 0,125 мкМ dNTPs, амплификационный буфер (Силекс), 1–2 ед. Taq-ДНК полимеразы (Сиб-Энзим). Предварительно все праймеры тщательно проверяли на отсутствие димеров в реакционной смеси после 45 циклов амплификации. Последовательности использованных праймеров приведены в табл. 1.

Реакционная смесь проходила предварительное прогревание в течение 10 мин при 95 °С и последующие 45 циклов денатурации (30 с, 95 °С), отжига (30 с, 58 °С) и полимеризации (30 с, 72 °С). Регистрацию спектра флуоресценции проводили в конце стадии элонгации. Каждую реакцию проводили в трипликate в каждом повторе, реакция считалась значимой при разбросе значения Ct в трипликate не больше 0,3–0,5 и значении коэффициента эффективности не ниже 1,7. Расчет коэффициента эффективности проводили с использованием программы LinRegPCR, версия 7.5, расчет относительной экспрессии – программы REST 2005. В качестве референсных генов для выравнивания внесенного в реакцию количества транскриптов использовали три гена «домашнего хозяйства»: белка комплекса ядерной поры (*NUP85*), глицил-тРНК-синтетазы (*GARS*) и гипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансферазы (*HPRT*). Значение относительной экспрессии генов *CRABP1* и *CRABP2* в опухолевой ткани по сравнению с условной нормой вычисляли с помо-

Таблица 1. Последовательности использованных праймеров (ПЦР в реальном времени)

Название праймера	Последовательность	Размер продукта, п.о.
<i>NUP85</i> зонд Прямой Обратный	FAM TTAGTGTGAGCGAGGCTGCTTT-BHQ1 5'-GTGTCAGACAGGTTCCATCAG-3' 5'-GAATGTCAGTCGGTCACTG-3'	108
<i>GARS</i> зонд Прямой Обратный	FAM-AAGGAATTATCGGAAGCCCTGA-BHQ1 5'-CTTTGTGAGATACTCCATGC-3' 5'-TGCTGTAGTTGCTCCATTC-3'	116
<i>HPRT</i> зонд Прямой Обратный	FAM-TTGTTGTAGGATATGCCCTTGACTA-BHQ1 5'-CCAGACTTTGTTGGATTTG-3' 5'-TTCCAGTTTCACTAATGACAC-3'	112
<i>CRABP1</i> зонд Прямой Обратный	FAM-GAGCCTGCATCCCTTCCTGAA-BHQ1 5'-CGATGAACCTATCCTGACG-3' 5'-TGGCAGCTCAGAACTATGA-3'	143
<i>CRABP2</i> Прямой Обратный	FAM-AGTGAGAATAAAATGGTCTGTGAGCA-BHQ1 5'-GTAAGAGCCTGGTGAAATG-3' 5'-CATGGTCAGGATCAGTTCC-3'	128

щью программы REST 2005 (рис. 1). Нормализация количества внесенных кДНК опухолевой и условно нормальной ткани проводилась по значениям C_t и эффективности для вышеуказанных референсных генов.

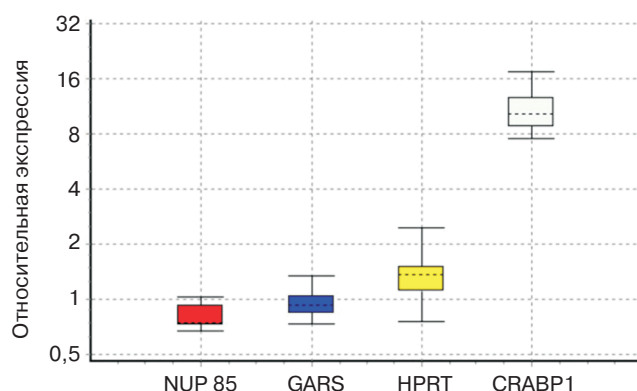


Рис. 1. Пример расчета относительной экспрессии гена *CRABP1* с помощью программы REST 2005

Иммуногистохимический анализ

Для ИГХ исследования использовали послеоперационный материал от 27 больных с диагнозом «монофазная синовиальная саркома» из архива Отдела патологической анатомии опухолей человека НИИ клинической онкологии РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. ИГХ исследование выполнено на серийных парафиновых срезах ткани опухолей по стандартной методике с использованием антител к белку *CRABP1* (HPA017203, Sigma). Экспрессия *CRABP1* детектировалась с помощью системы Super Sensitive Polymer-HRP (BioGenex). Депарафинизированные срезы обрабатывали в цитратном буфере (pH 6,0) в водяной бане при 95 °C в течение 40 мин. Оценка реакции в клетках первичных опухолей про-

водилась полуколичественным методом с учетом интенсивности окрашивания и количества антиген-позитивных клеток. Интенсивность ИГХ реакции оценивалась по 4-балльной системе: 0 — отсутствие реакции, 1 — низкая, 2 — умеренная, 3 — высокая. Также учитывалось количество клеток, позитивных по ИГХ, в процентном отношении к общему количеству опухолевых клеток.

Результаты

Изучение экспрессии мРНК *CRABP1* и *CRABP2* в образцах опухолей мягких тканей человека

Ранее с использованием экспериментальной системы, моделирующей метастазирование трансформированных клеток мезенхимального происхождения *in vivo* (панель клеточных линий трансформированных фибробластов сирийского хомяка единого происхождения с разным уровнем спонтанной метастатической активности), мы показали, что экспрессия белка *CRABP1* усиливает туморогенность и метастатический потенциал трансформированных фибробластов [34]. Полученные результаты, а также данные единственной имеющейся на сегодняшний день публикации, указывающей на возможное участие белка *CRABP1* в канцерогенезе синовиальных сарком [21], послужили основой для данного исследования. В данной работе впервые проведен анализ экспрессии генов *CRABP1* и *CRABP2* в образцах мезенхимальных опухолей различных гистологических типов.

Исследование уровня мРНК обоих генов проводилось с помощью метода ПЦР в реальном времени. Всего данным методом было проанализировано 28 образцов, 10 из которых относились к липосаркомам, 7 — к злокачественным фиброзным гистиоцитомам, 6 — к синовиальным саркомам и 5 — к

злокачественным шванномам. 13 опухолей имели забрюшинную локализацию, остальные 15 образцов являлись опухолями конечностей. 12 образцов этой группы получены от пациентов мужского пола и 16 образцов — женского, средний возраст пациентов составил 52,3 года (от 18 до 81 года).

После обработки первичных данных ПЦР в реальном времени (см. «Материалы и методы») численные значения относительной экспрессии *CRABP1* и *CRABP2* в опухолевой ткани по сравнению с условно нормальной тканью переводили в качественные категории (снижение/повышение/без изменений экспрессии). Анализ данных изменения экспрессии референсных генов показал, что разброс значений этих изменений составляет 0,6–1,87. В качестве условной границы изменения экспрессии изучаемых генов приняли значение, равное двум. Таким образом, при значении относительной экспрессии в диапазоне от 0,5 до 2 считали, что количества мРНК *CRABP1* и *CRABP2* в опухолевой и условно нормальной тканях одинаковы. При значении, превышающем 2, экспрессия *CRABP1* и *CRABP2* считалась повышенной, при значении, меньшем 0,5, — сниженной.

Данные сравнительного анализа экспрессии *CRABP1* и *CRABP2* в опухолях мягких тканей приведены в табл. 2.

трех ЗФГ наблюдалось параллельное увеличение экспрессии обоих генов. В отличие от СС и ЗФГ, в липосаркомах и злокачественных шванномах не было отмечено ни одного случая повышения экспрессии *CRABP1* либо *CRABP2*. Более того, для 40 и 37% данных опухолей было характерно снижение количества мРНК *CRABP1* или *CRABP2* соответственно. К сожалению, размер изучаемой выборки не позволил оценить корреляцию между экспрессией исследуемых генов и клинико-морфологическими характеристиками опухолей.

ИГХ анализ экспрессии *CRABP1* в образцах синовиальных сарком

На следующем этапе исследования нами была проанализирована продукция белка *CRABP1* в образцах синовиальных сарком с помощью ИГХ анализа. Коллекция парафиновых блоков послеоперационного материала от 27 пациентов с гистологически верифицированным диагнозом «монофазная синовиальная саркома» была предоставлена архивом Отдела патологической анатомии опухолей человека НИИ КО РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. В зависимости от морфологии клеток монофазные синовиальные саркомы делились на веретенчатые, круглоклеточные и смешанные варианты. Гистологически все

Таблица 2. Анализ экспрессии мРНК *CRABP1* и *CRABP2* в образцах опухолей мезенхимального происхождения

		Уровень мРНК в опухолевой ткани по сравнению с условно нормальной тканью					
		<i>CRABP1</i>			<i>CRABP2</i>		
	Количество образцов	Повышен	Снижен	Равен	Повышен	Снижен	Равен
Липосаркома	10	—	3	7	—	1	9
ЗФГ	7	3	4	—	4	1	2
Синовиальная саркома	6	0	1	3	3	—	3
Злокачественная шваннома	5	—	3	2	—	3	2

Повышение количества мРНК *CRABP1* наблюдалось в 20% исследуемых образцов, а понижение — в 40% случаев. Повышение количества мРНК *CRABP2* наблюдалось в 25% исследуемых образцов, а понижение — в 18% случаев. В то же время важно отметить, что характер изменений экспрессии существенно зависел от гистологического типа опухоли. Так, повышение экспрессии как *CRABP1*, так и *CRABP2* было характерно исключительно для группы синовиальных сарком и злокачественных фиброзных гистиоцитом и составляло 46 и 54% случаев соответственно. В сумме повышение экспрессии одного или обоих генов было обнаружено в 4 из 6 образцов СС и в 4 из 7 образцов ЗФГ. В двух образцах СС и

эти опухоли были оценены в соответствии с FNCLCC классификацией и отнесены к новообразованиям высокой (третьей) степени злокачественности (G3).

Данные по характеристике исследуемых образцов, а также результаты анализа экспрессии *CRABP1* представлены в табл. 3.

Результаты исследования показали высокий уровень экспрессии *CRABP1* (от умеренной (2 балла) до высокой (3 балла) интенсивности реакции) в 100% исследованных образцов синовиальных сарком. При этом процент клеток, демонстрирующих позитивную реакцию, варьировал в диапазоне от 50 до 90% и не зависел от морфологического строения опухоли.

Наиболее сильная реакция наблюдалась в ядрах опухолевых клеток, в большинстве случаев захва-

Таблица 3. Результаты ИГХ анализа белка *CRABP1* в образцах монофазных СС различного морфологического строения

Морфологический тип	Количество образцов	Количество образцов с позитивной ИГХ реакцией на <i>CRABP1</i>	% клеток с позитивной реакцией на <i>CRABP1</i>
Круглоклеточные	6	6	>80
Веретеноклеточные	16	16	>50
Смешанные	5	5	>60

тая и цитоплазму (ядерно-цитоплазматическая реакция). Примеры позитивной ИГХ реакции представлены на рис. 2.

двух генов в зависимости от гистологического типа опухоли. Так, повышение уровня экспрессии данных генов не выявляется в образцах липосарком

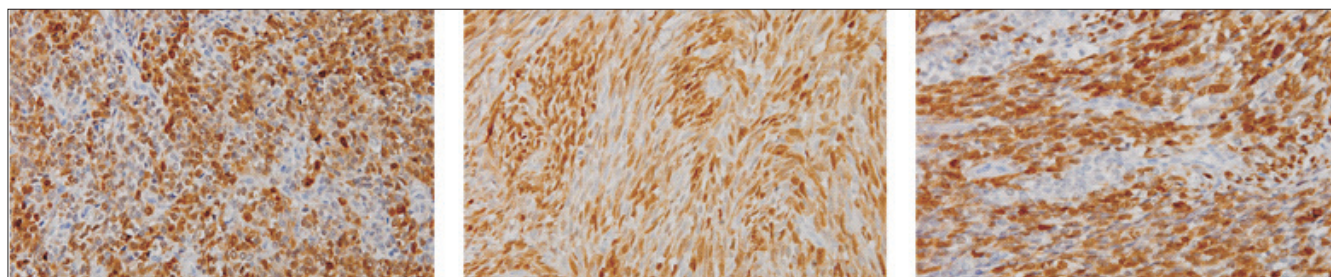


Рис. 2. Примеры ИГХ окрашивания белка *CRABP1* в образцах монофазных СС: а. круглоклеточная; б. веретеноклеточная; в. смешанная форма

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об ubicuitарном характере экспрессии белка *CRABP1* в монофазных синовиальных саркомах. К сожалению, не представлялось возможным сопоставить уровень экспрессии *CRABP1* с клиническими характеристиками в связи с тем, что большинство образцов представляли собой рецидивы опухолей пациентов, оперированных ранее по месту жительства. Однако сравнение между собой препаратов, полученных из рецидивов опухолей одного и того же пациента, оперированного в НИИ КО РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, не выявило значительных различий в характере и уровне экспрессии *CRABP1*.

Сравнение данных анализа экспрессии мРНК *CRABP1* методом ПЦР в реальном времени и белкового продукта *CRABP1* методом ИГХ демонстрирует наличие общих тенденций. Так, результаты анализа методом ПЦР выявили повышение уровня мРНК *CRABP1* в 50% образцов, в то время как результаты ИГХ обнаружили экспрессию белкового продукта в 100% случаев. Количественные различия могут объясняться разной чувствительностью метода и небольшой выборкой анализируемых образцов. Кроме того, известно, что уровень мРНК не всегда совпадает с продукцией белка.

Таким образом, нами впервые проведен анализ экспрессии мРНК *CRABP1* и *CRABP2*, а также иммуногистохимический анализ продукции *CRABP1* в образцах опухолей мезенхимального происхождения. Полученные результаты свидетельствуют о дифференциальном характере экспрессии иссле-

и злокачественных шванном, но обнаруживается в образцах СС и ЗФГ. Более того, мы впервые показали, что гиперэкспрессия белка *CRABP1* характерна для монофазных синовиальных сарком. Полученные данные указывают на необходимость дальнейших исследований для выявления корреляций экспрессии данного белка с клиническими характеристиками с целью определения возможности использования белка *CRABP1* в качестве прогностического маркера и потенциальной мишени для таргетной терапии синовиальных сарком.

ЛИТЕРАТУРА

- Ahlquist T., Lind G.E., Costa V.L. et al. Gene methylation profiles of normal mucosa, and benign and malignant colorectal tumors identify early onset markers. *Mol. Cancer*. 2008, v. 7, p. 94.
- Banz C., Ungethuem U., Kuban R.J. et al. The molecular signature of endometriosis-associated endometrioid ovarian cancer differs significantly from endometriosis-independent endometrioid ovarian cancer. *Fertil. Steril.* 2010, v. 94, No. 4, p. 1212-1217.
- Blaese M.A., Santo-Hoeltje L., Rodemann H.P. *CRABP I* expression and the mediation of the sensitivity of human tumor cells to retinoic acid and irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 2003, v. 79, No. 12, p. 981-991.
- Breitman T.R., Selonick S.E., Collins S.J. Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1980, v. 77, No. 5, p. 2936-2940.
- Budhu A., Gillilan R., Noy N. Localization of the RAR interaction domain of cellular retinoic acid binding protein-II. *J. Mol. Biol.* 2001, v. 305, No. 4, p. 939-949.
- Bushue N., Wan Y.J. Retinoid pathway and cancer therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2010, v. 62, No. 13, p. 1285-1298.
- Calmon M.F., Rodrigues R.V., Kaneto C.M. et al. Epigenetic silencing of *CRABP2* and *MX1* in head and neck tumors. *Neoplasia*. 2009, v. 11, No. 12, p. 1329-1339.
- Dressler D., Sarang Z., Szondy Z. et al. Expression of retinoid-related genes in serum-free cultures of normal, immortalized and malignant human oral keratinocytes. *Int. J. Oncol.* 2002, v. 20, No. 5, p. 897-903.
- Eichele G. Retinoic acid induces a pattern of digits in anterior half wing buds that lack the zone of polarizing activity. *Development*. 1989, v. 107, No. 4, p. 863-867.

10. Guruvayoorappan C., Kuttan G. 13 cis-retinoic acid regulates cytokine production and inhibits angiogenesis by disrupting endothelial cell migration and tube formation. *J. Exp. Ther. Oncol.* 2008, v. 7, No. 3, p. 173-182.
11. Hawthorn L., Stein L., Varma R. et al. *TIMP1* and *SERPIN-A* overexpression and *TFE3* and *CRABP1* underexpression as biomarkers for papillary thyroid carcinoma. *Head Neck.* 2004, v. 26, No. 12, p. 1069-1083.
12. Hoffmann S., Rockenstein A., Ramaswamy A. et al. Retinoic acid inhibits angiogenesis and tumor growth of thyroid cancer cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2007, v. 264, No. 1-2, p. 74-81.
13. Itoh Y., Ishikawa M., Naito M., Hashimoto Y. Protein knockdown using methyl bestatin-ligand hybrid molecules: design and synthesis of inducers of ubiquitination-mediated degradation of cellular retinoic acid-binding proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 2010, v. 132, No. 16, p. 5820-5826.
14. Lee H.S., Kim B.H., Cho N.Y. et al. Prognostic implications of and relationship between CpG island hypermethylation and repetitive DNA hypomethylation in hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2009, v. 15, No. 3, p. 812-820.
15. Lee J.H., Yoon J.H., Yu S.J. et al. Retinoic acid and its binding protein modulate apoptotic signals in hypoxic hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett.* 2010, v. 295, No. 2, p. 229-235.
16. Levadoux-Martin M., Li Y., Blackburn A. et al. Perinuclear localisation of cellular retinoic acid binding protein I mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006, v. 340, No. 1, p. 326-331.
17. Lu Y., Lemon W., Liu P.Y. et al. A gene expression signature predicts survival of patients with stage I non-small cell lung cancer. *PLoS Med.* 2006, v. 3, No. 12, p. e467.
18. Luo P., Lin M., Lin M. et al. Function of retinoid acid receptor alpha and p21 in all-trans-retinoic acid-induced acute T-lymphoblastic leukemia apoptosis. *Leuk. Lymphoma.* 2009, v. 50, No. 7, p. 1183-1189.
19. Mallikarjuna K., Sundaram C.S., Sharma Y. et al. Comparative proteomic analysis of differentially expressed proteins in primary retinoblastoma tumors. *Proteomics Clin. Appl.* 2010, v. 4, No. 4, p. 449-463.
20. Miyake T., Ueda Y., Matsuzaki S. et al. *CRABP1*-reduced expression is associated with poorer prognosis in serous and clear cell ovarian adenocarcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2011, v. 137, No. 4, p. 715-722.
21. Nagayama S., Katagiri T., Tsunoda T. et al. Genome-wide analysis of gene expression in synovial sarcomas using a cDNA microarray. *Cancer Res.* 2002, v. 62, No. 20, p. 5859-5866.
22. Neubauer H., Clare S.E., Kurek R. et al. Breast cancer proteomics by laser capture microdissection, sample pooling, 54-cm IPG IEF, and differential iodine radioisotope detection. *Electrophoresis.* 2006, v. 27, No. 9, p. 1840-1852.
23. Okuducu A.F., Janzen V., Ko Y. et al. Cellular retinoic acid-binding protein 2 is down-regulated in prostate cancer. *Int. J. Oncol.* 2005, v. 27, No. 5, p. 1273-1282.
24. Pavone M.E., Reierstad S., Sun H. et al. Altered retinoid uptake and action contributes to cell survival in endometriosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2010, v. 95, No. 11, p. E300-9.
25. Pfoertner S., Goelden U., Hansen W. et al. Cellular retinoic acid binding protein I: expression and functional influence in renal cell carcinoma. *Tumour Biol.* 2005, v. 26, No. 6, p. 313-323.
26. Ross A.C. Cellular metabolism and activation of retinoids: roles of cellular retinoid-binding proteins. *FASEB J.* 1993, v. 7, No. 2, p. 317-327.
27. Ruff S.J., Ong D.E. Cellular retinoic acid binding protein is associated with mitochondria. *FEBS Lett.* 2000, v. 487, No. 2, p. 282-286.
28. Sadikoglou E., Magoulas G., Theodoropoulou C. et al. Effect of conjugates of all-trans-retinoic acid and shorter polyene chain analogues with amino acids on prostate cancer cell growth. *Eur. J. Med. Chem.* 2009, v. 44, No. 8, p. 3175-3187.
29. Siddiqui N.A., Thomas E.J., Dunlop W., Redfern C.P. Retinoic acid receptors and retinoid binding proteins in endometrial adenocarcinoma: differential expression of cellular retinoid binding proteins in endometrioid tumors. *Int. J. Cancer.* 1995, v. 64, No. 4, p. 253-263.
30. Tanaka K., Imoto I., Inoue J. et al. Frequent methylation-associated silencing of a candidate tumor-suppressor, *CRABP1*, in esophageal squamous-cell carcinoma. *Oncogene.* 2007, v. 26, No. 44, p. 6456-6468.
31. Tang X.H., Vivero M., Gudas L.J. Overexpression of *CRABP1* in suprabasal keratinocytes enhances the proliferation of epidermal basal keratinocytes in mouse skin topically treated with all-trans retinoic acid. *Exp. Cell. Res.* 2008, v. 314, No. 1, p. 38-51.
32. Won J.Y., Nam E.C., Yoo S.J. et al. The effect of cellular retinoic acid binding protein-I expression on the CYP26-mediated catabolism of all-trans retinoic acid and cell proliferation in head and neck squamous cell carcinoma. *Metabolism.* 2004, v. 53, No. 8, p. 1007-1012.
33. Wu X., Blanck A., Norstedt G. et al. Identification of genes with higher expression in human uterine leiomyomas than in the corresponding myometrium. *Mol. Hum. Reprod.* 2002, v. 8, No. 3, p. 246-254.
34. Каинов Я.А., Фаворская И.А., Антошина Е.Е. и соавт. Роль белка *CRABP1* в формировании высокометастазного фенотипа RSV-трансформированных фибробластов сирийского хомяка. *Российский Биотерапевтический Журнал.* 2011, v. 10, No. 2, p. 37-44.

Статья поступила 14.03.2013 г., принята к печати 03.04.2013 г.
Рекомендована к публикации Б.Ю. Боянню

CRABP1 AND CRABP2 EXPRESSION IN SOFT TISSUE SARCOMAS

Tchevkina E.M., Favorskaya I.A., Kainov Y.A., Chemeris G.Y., Komelkov A.V., Dyakova N.A.
FGBU N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow, Russian Federation

Key words: synovial sarcomas, malignant fibrous histiocytomas, malignant schwannomas, liposarcomas, *CRABP1*, *CRABP2*, IHC analysis, real-time PCR

Background. The study is devoted to the research of *CRABP1* and *CRABP2* mRNA as well as *CRABP1* protein expression in human soft tissue sarcomas.

Methods. Real time PCR, IHC analysis.

Results. Here we for the first time studied the *CRABP1* and *CRABP2* genes expression by real time PCR in the samples of malignant mesenchymal tumors, including synovial sarcomas, malignant fibrous histiocytomas, malignant schwannomas and liposarcomas. We also analyzed *CRABP1* protein level using immunohistochemistry in the samples of monophasic synovial sarcomas. Increase of *CRABP1* and *CRABP2* mRNA levels was revealed only in the synovial sarcomas and malignant fibrous histiocytomas samples (46% for *CRABP1* and 54% for *CRABP2*). Opposite to synovial sarcomas and malignant fibrous histiocytomas, in the samples of malignant schwannomas and liposarcomas no elevation of *CRABP1* or *CRABP2* mRNA level was found; moreover, in 40% of these kind of tumors the decrease of *CRABP1* mRNA level was observed. Immunohistochemical analysis revealed high level of *CRABP1* protein in 100% of monophasic synovial sarcomas.

Conclusion. The obtained results pointed on the differential *CRABP1*, -2 proteins expression in malignant soft tissue tumors depending on the histological type. The presented data open wide perspectives for further studies of *CRABP1* as a potential prognostic marker and target for translational therapy of synovial sarcomas.