

Роль ABC-транспортеров в формировании лекарственной устойчивости к бортезомибу при множественной миеломе

Л.А. Лалетина, Н.И. Моисеева, Д.А. Климова, А.А. Ставровская

НИИ канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Лидия Александровна Лалетина ranlidia@gmail.com

Цель исследования — изучение роли ABC-транспортеров и фактора транскрипции белка YB-1 в формировании лекарственной устойчивости к ингибитору протеасом бортезомибу при множественной миеломе.

Материалы и методы. В качестве моделей использовали культуры RPMI8226 и NCI-H929 и их резистентные к бортезомибу сублинии.

Результаты. Два основных белка ABC-транспортера — P-гликопротеин и MRP1 не участвуют в возникновении устойчивости к бортезомибу, более того, данный препарат способствует снижению их экспрессии. Экспрессия гена MVP повышалась только в устойчивом варианте RPMI8226/btz-6, но не в H929/btz-6. Также только в RPMI8226/btz-6 локализация белка YB-1, который является фактором транскрипции для генов MDRI, MRP1 и MVP, изменялась — становилась диффузной в 20 % клеток по сравнению с 7 % клеток в родительской линии RPMI8226. Единственный ABC-транспортер, экспрессия которого увеличивалась и в сублинии RPMI8226/btz-6, и в сублинии H929/btz-6, был ген BCRP. Также для этих же сублиний была показана перекрестная устойчивость к доксорубину.

Заключение. Таким образом, активация ABC-транспортеров не является ключевым механизмом формирования лекарственной устойчивости к бортезомибу. Некоторую роль может играть белок MVP, а повышение экспрессии BCRP объясняет возникновение устойчивости к доксорубину, но не к бортезомибу, так как последний не является субстратом BCRP.

Ключевые слова: бортезомиб, множественная миелома, множественная лекарственная устойчивость, ABC-транспортер, YB-1, P-гликопротеин, MRP1, BCRP, MVP

Для цитирования: Лалетина Л.А., Моисеева Н.И., Климова Д.А., Ставровская А.А. Роль ABC-транспортеров в формировании лекарственной устойчивости к бортезомибу при множественной миеломе. *Успехи молекулярной онкологии* 2019;6(1):49–56.

DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-1-49-56

The role of ABC transporters in drug resistance to bortezomib in multiple myeloma

L.A. Laletina, N.I. Moiseeva, D.A. Klimova, A.A. Stavrovskaya

Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia;
24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Background. In our work, we investigated the role of ABC transporters and the transcription factor YB-1 protein in the formation of drug resistance to the proteasome inhibitor bortezomib in multiple myeloma.

Materials and methods. We used the RPMI8226 and NCI-H929 cultures and their bortezomib-resistant sublines as models.

Results. Two major ABC transporter proteins, P-glycoprotein and MRP1, are not involved in the emergence of resistance to bortezomib, moreover, bortezomib contributed to decrease of these genes expression. Expression of the MVP gene was increased only in the resistant RPMI8226/btz-6 variant, but not in H929/btz-6. The localization of the YB-1 protein, a transcription factor for the MDRI, MRP1 and MVP genes, changed only in RPMI8226/btz-6 cells, as well, it became diffuse in 20 % of the cells as compared to 7 % of the cells in the RPMI8226 parent line. The only ABC transporter gene, activated in both RPMI8226/btz-6 and H929/btz-6 sublines, was BCRP. Cross-resistance to doxorubicin is also shown for these sublines.

Conclusion. Thus, the activation of ABC transporters is not a key mechanism for the formation of bortezomib drug resistance. MVP protein may play certain role, and an increase in the BCRP expression explains the emergence of resistance to doxorubicin, but not to bortezomib, since the latter is not a substrate of BCRP.

Key words: bortezomib, multiple myeloma, multidrug resistance, ABC- transporter, YB-1, P-glycoprotein, MRP1, BCRP, MVP

For citation: Laletina L.A., Moiseeva N.I., Klimova D.A., Stavrovskaya A.A. The role of ABC transporters in drug resistance to bortezomib in multiple myeloma. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2019;6(1):49–56.

Введение

Множественная миелома (ММ) — злокачественное новообразование, происходящее из терминально дифференцированных В-лимфоцитов — плазматических клеток с иммунофенотипом CD38+/CD138+, продуцирующих моноклональный иммуноглобулин. ММ составляет приблизительно 1 % среди всех злокачественных опухолей и 13 % среди гемопоэтических опухолей [1].

Бортезомиб — ингибитор активности протеасом (PS-341, Velcade) — сейчас входит в 1-ю линию химиотерапии ММ [2]. Однако с течением времени к нему развивается лекарственная устойчивость, механизмы формирования которой пока мало изучены.

Один из основных видов лекарственной устойчивости — множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) — система защиты клеток одновременно от многих лекарств, различающихся по химической структуре и механизму действия на клетку [3]. Среди различных механизмов МЛУ опухолей наиболее охарактеризованным является повышенная активность белка семейства ABC (ATP binding cassette) Р-гликопротеина (Pgp), кодируемого геном *MDR1* (*ABCB1*). Белок Pgp, используя энергию аденозинтрифосфата, транспортирует группы различающихся по структуре веществ из цитозоля во внеклеточное пространство. В семейство ABC-транспортеров входит несколько других мембранных белков, имеющих отношение к МЛУ, таких как белки семейства MRP (семейство ABCС), белок BCRP (ABCG2) и др. [4].

Белок YB-1 является ДНК/РНК-связывающим белком с различными функциями [5]. Белок YB-1 чаще находится в цитоплазме клеток в комплексе с РНК, регулируя трансляцию, однако при фосфорилировании Akt-киназой может перемещаться в ядра клеток [6]. В ядре YB-1 функционирует как фактор транскрипции, регулируя экспрессию генов, содержащих в промоторе Y-бокс, в том числе генов МЛУ *MDR1* и *MRP1* [7] и гена *MVP* (LRP) [8].

Влияние бортезомиба на экспрессию генов и белков, вовлеченных в МЛУ, недостаточно изучено [9]. В одной из наших работ мы показали, что клетки линии хронического миелолейкоза K562 не приобретают устойчивости к бортезомибу, несмотря на активацию Pgp, тогда как линия K562/i-S9 с трансфицированным геном *MDR1* приобретает устойчивость к бортезомибу, и в ней экспрессия Pgp увеличивается как на уровне матричной РНК (мРНК), так и на уровне белка [10]. Таким образом, роль ABC-транспортеров в формировании лекарственной устойчивости все еще остается областью активных исследований.

Цель исследования — оценка участия ABC-транспортеров в возникновении устойчивости к бортезомибу в клеточных линиях ММ.

Материалы и методы

Клеточные культуры. В работе использовали клетки линий ММ RPM18226 и NCI-H929. Линия

NCI-H929 была получена из коллекции клеточных культур ATCC, линия RPM18226 — из российской коллекции культур клеток позвоночных Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Устойчивые к бортезомибу сублинии RPM18226/btz-6 и H929/btz-6 выведены путем длительного культивирования (около полугода) в среде с добавлением бортезомиба (Selleckchem, США). Клетки культивировали в среде RPM1640 с добавлением 10 % телячьей эмбриональной сыворотки (РАА, Австрия) и 50 мкг/мл гентамицина (Россия). Все линии клеток культивировали при температуре 37 °С в атмосфере с 5 % CO₂.

МТТ-тест. Клетки рассевали в 96-луночные планшеты по 20–25 × 10³ клеток в лунку. Препараты (бортезомиб, доксорубин (Sigma-Aldrich, США) в объеме 15 мкл добавляли в различных концентрациях в тот же день. В контрольные лунки добавляли 15 мкл бессысывороточной среды. Клетки культивировали в присутствии химиопрепаратов в течение 48 ч. Затем в лунки добавляли реагент МТТ в концентрации 5 мг/мл в объеме 20 мкл на лунку. Через 3 ч среду с реагентом удаляли и осадок растворяли в 60 мкл ДМСО. Уровень оптической плотности определяли с помощью спектрофотометра MultiScan FC (Thermo Scientific, США) при длине волны 492 нм.

Полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ). Тотальную РНК выделяли из клеток реагентом ExtractRNA (Евроген, Россия) по протоколу производителя. Качество РНК проверяли с помощью электрофореза в 1 % агарозном геле, содержащем 0,01 % бромистого этидия. Применяли ПЦР-РВ: для синтеза комплементарной ДНК использовали реакционную смесь ОТ-РТ (Синтол, Россия). При постановке ПЦР-РВ применяли набор для проведения ПЦР-РВ и интеркалирующий флуоресцентный агент Eva Green (Синтол, Россия). Обе реакционные смеси готовили по протоколу производителя. Реакция ставилась в амплификаторе компании Bio-Rad (США). Шаги амплификации: 95°С — 5:00 мин, 72°С — 00:10 мин, 60°С — 00:30 мин, 72°С — 00:30 мин. Нормализацию результатов проводили по housekeeping гену *RPL27*. Использовали следующие пары праймеров: YB-1 forward CCCCAGGAAGTACCTTCGC, reverse AGCGTCTATAATGGTTACGGTCT; MDR1 forward GGGATGGTCAGTGTGATGGA, reverse GCTATCGTGGTG-GCAAACAATA; MRP1 forward GTGAATCGTGCC-ATCGACATA, reverse GCTTGGGACGGAAGGGAATC; MVP forward TACATCCGGCA-GGACAATGAG, reverse CTGTGCAGTAGTGACGTGGG; BCRP forward TGAGCCTACAAGTGGCTTAGA, reverse CCCTGCTTAGACAT-CCTTTTCAG; RPL27 forward ACCGCTACCCCGCAAAGTG; reverse CCCGTCCGGCCTTGCGTTTA. Проводили 3 независимых эксперимента. Оценку результатов ПЦР-РВ осуществляли методом ΔΔCt (разница циклов амплификации исследуемого гена и контрольного гена).

Иммуноцитохимическая окраска клеток и проточная цитофлуориметрия. Для определения внутриклеточной локализации белка γ -H2AX клетки растили в 12-луночном плато, фиксировали 4 % раствором параформальдегида и нарушали целостность клеточной мембраны 0,1 % Triton X-100. Затем их инкубировали с кроличьими поликлональными антителами к γ -H2AX (Институт белка РАН, Россия) в течение 1,5 ч. После инкубации с антителами клетки трижды промывали PBS. Далее клетки 1 ч инкубировали со вторыми антителами к иммуноглобулину класса G кролика, меченными AlexaFluor488 (Invitrogen, США), в которые также добавляли агент Hoechst 33258 в разведении 1:1000. Агент Hoechst 33258 способен связываться с ДНК, таким образом позволяя определить локализацию ядра в клетке.

Экспрессию белка Pgp (BD Pharmingen, США) в клетках RPMI8226 и RPMI8226/btz-6, NCI-H929 и H929/btz-6 оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии на приборе BD FACS CantoII. Получали суспензию исследуемых клеток и инкубировали ее в течение 40 мин с напрямую мечеными FITC антителами, в темноте при комнатной температуре. Отмывали в PBS дважды.

Вестерн-блоттинг. Клетки (2 млн) суспендировали в 150 мкл лизирующего буфера RIPA buffer x1 (Thermo Scientific, США) в течение 20–30 мин при температуре +4 °С. Далее лизат центрифугировали на 13 400 об/мин в течение 30 мин и отбирали чистый супернатант (лизат), затем добавляли x1 Sample buffer (1 М Трис-НСl, рН 6,8, 10 % додецилсульфата натрия (SDS), 50 % глицерина, 10 % меркаптоэтанола и бромфенолового синего), помещали в водяную баню при температуре 96 °С на 10 мин. Белки разделяли в 10 % полиакриламидном геле в присутствии 10 % SDS и переносили на нитроцеллюлозные мембраны (Amersham, США), после инкубировали в 5 % БСА (бычий сывороточный альбумин) в 1x TBST (Трис-буфер рН 7,5 с 0,005 % твином) в течение 1 ч при комнатной температуре и постоянном покачивании. Затем мембраны промывали в TBST и инкубировали со специфическими моноклональными мышинными антителами против γ -H2AX (Институт белка РАН, Россия) и с антителами против актина, мечеными пероксидазой, в разведении 1:500 в течение ночи при температуре 4 °С. Далее мембраны отмывали в TBST 3 раза по 10 мин и инкубиро-

вали со вторыми мышинными антителами, конъюгированными с пероксидазой (Jackson ImmunoResearch, США), в разведении 1:1000. После этого мембрану отмывали 3 раза в TBST и проявляли с помощью ECL-реактанта (Thermo Fisher, США). Съемку проводили на приборе для люминесцентного анализа ImageQuant Las 4000 (США).

Статистический анализ. Опыты ставили в 2–3 повторях, данные представлены как $M \pm SD$. Статистический анализ данных проводили с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни. Статистически значимой разницей считалась при $p < 0,05$.

Результаты

Оценка лекарственной устойчивости исследуемых линий ММ. В ходе длительной культивации (20 нед) клеточных культур RPMI8226 и NCI-H929 с повышающимися концентрациями бортезомиба были получены устойчивые к нему сублинии RPMI8226/btz-6 и H929/btz-6. На 1-м этапе оценивали уровень полученной устойчивости к бортезомибу и наличие перекрестной резистентности к доксорубину (табл. 1).

Из табл. 1 видно, что для сублинии RPMI8226/btz-6 была достигнута двукратная устойчивость к бортезомибу ($p = 0,028$). В то же время в RPMI8226/btz-6 снижалась чувствительность к доксорубину в 3 раза ($p = 0,022$), а в H929/btz-6 наблюдалась тенденция к снижению чувствительности к этим препаратам ($p = 0,1$).

Уровень экспрессии генов MDR1 и гена γ -H2AX в чувствительных и устойчивых клеточных линиях. На следующем этапе мы оценили изменение экспрессии мРНК генов ABC-транспортёров и гена γ -H2AX (рис. 1, 2).

Экспрессия мРНК генов *MDR1* и *MRP1* снижалась в обеих резистентных сублиниях примерно в 2,0–2,5 раза. Так, для сублинии RPMI8226/btz-6 мы наблюдали снижение экспрессии гена *MDR1* в 2,4 раза ($p = 0,001$), а гена *MRP1* – в 1,7 раза ($p = 0,0022$), для сублинии H929/btz-6 наблюдалась лишь тенденция к снижению экспрессии этих генов в 2 раза (*MDR1* $p = 0,14$; *MRP1* $p = 0,1$) Только экспрессия гена *BCRP* увеличивалась в обеих устойчивых сублиниях: в RPMI8226/btz-6 – в 2,8 раза ($p = 0,0006$), в H929/btz-6 – в 2,3 раза ($p = 0,008$).

Белок LRP/MVP не является ABC-транспортёром. Это мажорный белок крупных рибонуклеопротеиновых частиц, он вовлечен в транспорт рецепторов

Таблица 1. Оценка степени чувствительности клеточных культур к бортезомибу и доксорубину (значения IC_{50} , нМ)

Table 1. Evaluation of cell line sensitivity to bortezomib and doxorubicin (IC_{50} values, nM)

Препарат Drug	RPMI8226	RPMI8226/ btz-6	Индекс устойчивости Resistance index	NCI-H929	H929/ btz-6	Индекс устойчивости Resistance index
Бортезомиб Bortezomib	6,7 ± 2,6	16,0 ± 2,17	2,3	6,5 ± 0,8	12,7 ± 1,9	2,0
Доксорубин Doxorubicin	73,0 ± 5,7	285,0 ± 9,2	3,0	23,0 ± 1,0	35,0 ± 2,0	1,5

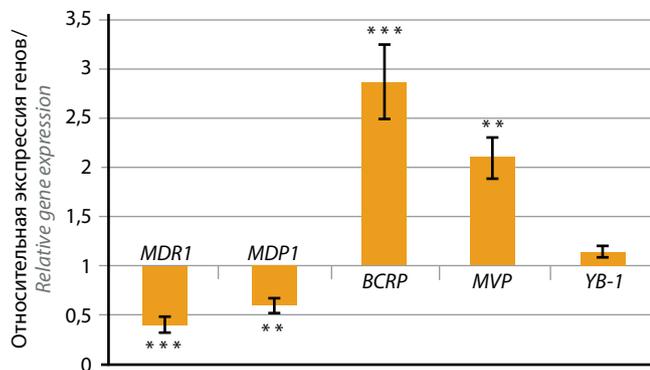


Рис. 1. Экспрессия матричной РНК различных генов в устойчивой сублинии RPMI8226/btz-6 относительно родительской линии RPMI8226. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Fig. 1. Expression of messenger RNA of various genes in the resistant subline RPMI8226/btz-6 relative to the parental RPMI8226 line. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

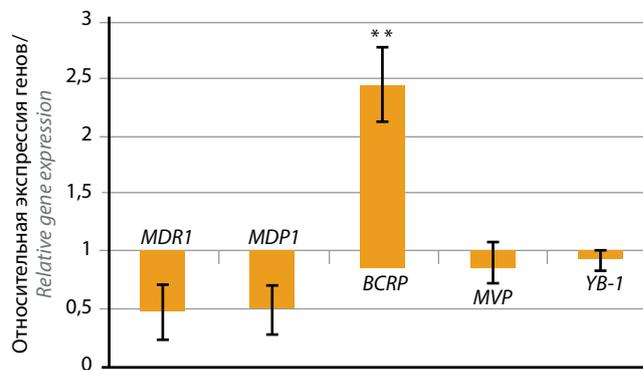


Рис. 2. Экспрессия матричной РНК различных генов в устойчивой сублинии H929/btz-6 относительно родительской линии NCI-H929. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Fig. 2. Expression of messenger RNA of various genes in the resistant subline H929/btz-6 relative to the parental NCI-H929 line. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

Таблица 2. Экспрессия белка Pgp на поверхности клеток родительских линий и устойчивых к бортезомибу сублиний (проточная цитофлуоретрия), %
Table 2. Pgp protein expression on the surface of the cells of the parental lines and sublines resistant to bortezomib (flow cytometry), %

Белок Protein	RPMI8226	RPMI8226/btz-6	NCI-H929	NCI-H929/btz-6	RPMI8226 + доксорубин 72 ч RPMI8226 + doxorubicin 72 hour	K562/i-S9*
Pgp (MDR1)	0	0	0	0	0	90

*Положительный контроль (клетки линии хронического миелолейкоза, гиперэкспрессирующие белок Pgp).

*Positive control (cell line of chronic myeloid leukemia hyperexpressing Pgp protein).

стероидных гормонов внутри клетки [11]. Поскольку известно, что этот белок может участвовать в детерминации МЛУ, мы охарактеризовали выбранные нами клеточные линии по количеству мРНК MVP. Экспрессия гена MVP не менялась в сублинии H929/btz-6 и возросла в 2,1 раза ($p = 0,009$) в сублинии RPMI8226/btz-6 по сравнению с родительской культурой.

Экспрессия гена YB-1 не менялась в устойчивых сублиниях по сравнению с родительскими линиями. Таким образом, во всех исследованных нами устойчивых к бортезомибу сублиниях возрастает экспрессия мРНК гена BCRP.

Оценка уровня экспрессии Р-гликопротеина в устойчивых сублиниях. Ген MDR1 экспрессировался во всех исследованных нами линиях, поэтому следующей нашей задачей стала оценка продукта этого гена – белка Pgp.

Мы показали полное отсутствие экспрессии белка Pgp на поверхности клеток как в родительских, так и в устойчивых сублиниях при длительном и краткосрочном воздействии бортезомиба. Известно, что доксорубин является не только субстратом, но и активатором экспрессии белка Pgp. Однако краткосрочная (72 ч) инкубация с доксорубином также не привела к активации трансляции Pgp. В табл. 2 представлены результаты оценки количества белка Pgp на клетках родительских и устойчивых линий RPMI8226/btz-6 и H929/btz-6 с помощью проточной цитофлуоретрии.

Таким образом, формирование устойчивости к бортезомибу не связано с активацией белка Pgp.

Оценка количества и локализации белка YB-1 в парах родительских и устойчивых к бортезомибу клеток ММ. В следующей части работы мы исследовали воздействие бортезомиба на количество белка YB-1 при длительной инкубации с этим веществом в клетках линии RPMI8226 и сублинии RPMI8226/btz-6. Мы показали, что экспрессия белка YB-1 не меняется в устойчивых к бортезомибу клетках сублинии RPMI8226/btz-6 и остается такой же высокой, как и в клетках линии RPMI8226 (рис. 3).

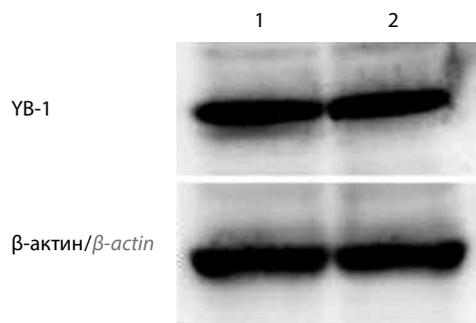


Рис. 3. Количество белка YB-1 в родительской и устойчивой линии: 1 – RPMI8226 и 2 – RPMI8226/btz-6

Fig. 3. YB-1 protein amount in the parental and resistant lines: 1 – RPMI8226 and 2 – RPMI8226/btz-6

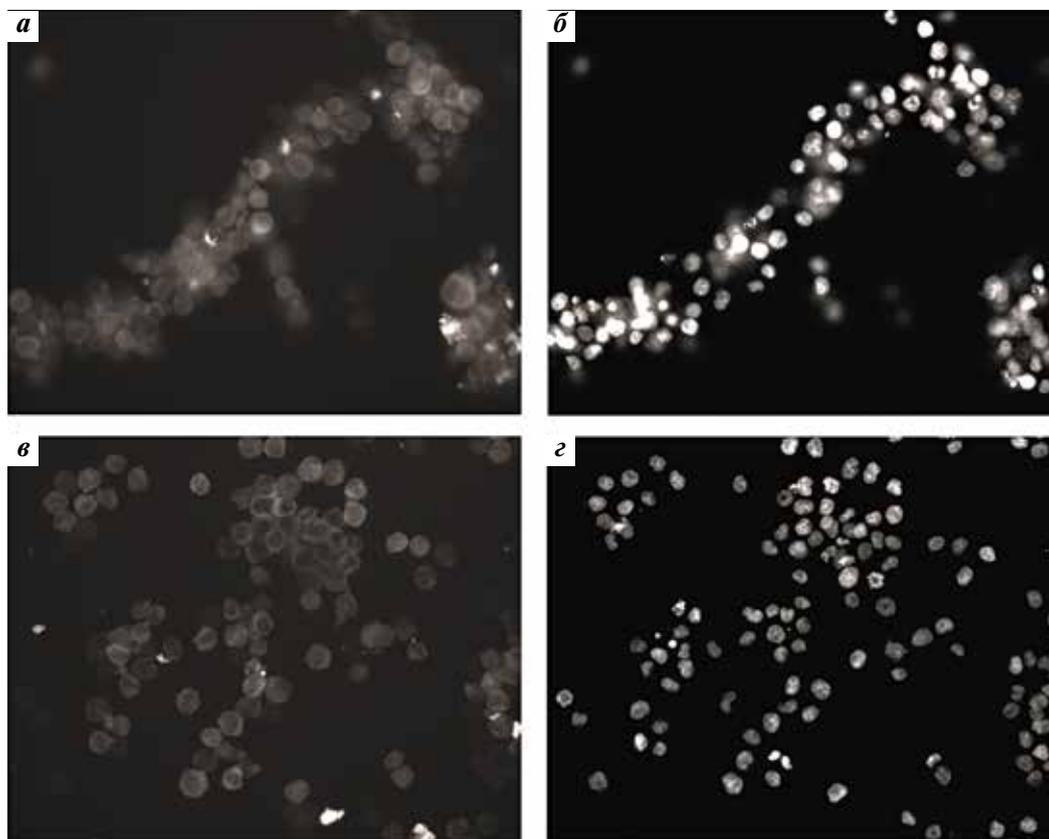


Рис. 4. Локализация белка YB-1 в опухолевых клетках RPMI8226 и RPMI8226/btz-6: а – клетки RPMI8226, белок YB-1; б – ядра клеток RPMI8226, окрашенные Hoechst; в – клетки RPMI8226/btz-6, белок YB-1; г – ядра клеток RPMI8226/btz-6, окрашенные Hoechst

Fig. 4. YB-1 protein localization in RPMI8226 and RPMI8226/btz-6 cell lines: а – RPMI8226 cells, YB-1 protein; б – RPMI8226 cell nuclei stained with Hoechst; в – RPMI8226/btz-6 cells, YB-1 protein; г – RPMI8226/btz-6 cell nuclei stained with Hoechst

Поскольку YB-1, перемещаясь в ядро, в качестве транскрипционного фактора может активировать гены МЛУ, мы сравнили его локализацию на парах родительских и устойчивых линий клеток RPMI8226 и RPMI8226/btz-6, NCI-H929 и H929/btz-6.

В исследуемых линиях мы не обнаружили явной ядерной локализации белка YB-1, т.е. случая, когда белок обнаруживается только в ядре и его практически нет в цитоплазме клеток. В родительской линии RPMI8226 белок YB-1 локализован в цитоплазме в 93 % клеток, однако в 7 % клеток мы наблюдали его диффузную локализацию, т.е. когда YB-1 равномерно распределен между цитоплазмой и ядром клетки. Однако в сублинии RPMI8226/btz-6 количество клеток с диффузной локализацией увеличивается в 3 раза – до 20 %. В клетках линии NCI-H929 и ее сублинии H929/btz-6 мы не наблюдали различий в локализации белка YB-1, а именно в 95 % клеток обеих культур этот белок определялся только в цитоплазме (рис. 4, 5).

Обсуждение

Настоящая работа посвящена вопросу о механизмах формирования устойчивости к бортезомибу при ММ. Наша исходная гипотеза заключалась в том, что устойчивость к бортезомибу может возникать за счет активации белков МЛУ.

Несмотря на невысокие уровни устойчивости изученных клеток, проведенная работа позволяет сделать несколько важных заключений.

Во-первых, данные показывают, что в устойчивой к бортезомибу сублинии RPMI8226/btz-6 снижается экспрессия мРНК генов *MDR1* и *MRP1* и не активируется синтез Pgp. Существуют работы на клетках сублинии хронического миелолейкоза и низкодифференцированной липосаркомы с гиперэкспрессией Pgp, где показано, что бортезомиб при краткосрочном воздействии приводит к снижению экспрессии *MDR1* эффективнее, чем в клетках, где он экспрессируется на относительно среднем уровне [12, 13]. Наши данные показывают, что и при долгосрочном воздействии бортезомиба этот эффект снижения экспрессии *MDR1* сохраняется.

Во-вторых, нами показано, что экспрессия другого гена, ответственного за МЛУ (*MVP*), в клетках сублинии RPMI8226/btz-6 повышалась в 2 раза по сравнению с клетками исходной линии RPMI8226. В то же время в клетках сублинии H929/btz-6 уровень экспрессии этого гена не изменялся. Мы полагаем, что возрастание экспрессии *MVP* в клетках сублинии RPMI8226/btz-6 связано с формированием устойчивости к бортезомибу.

В литературе существуют противоречивые данные о роли белка MVP в прогнозе лечения и выживаемости

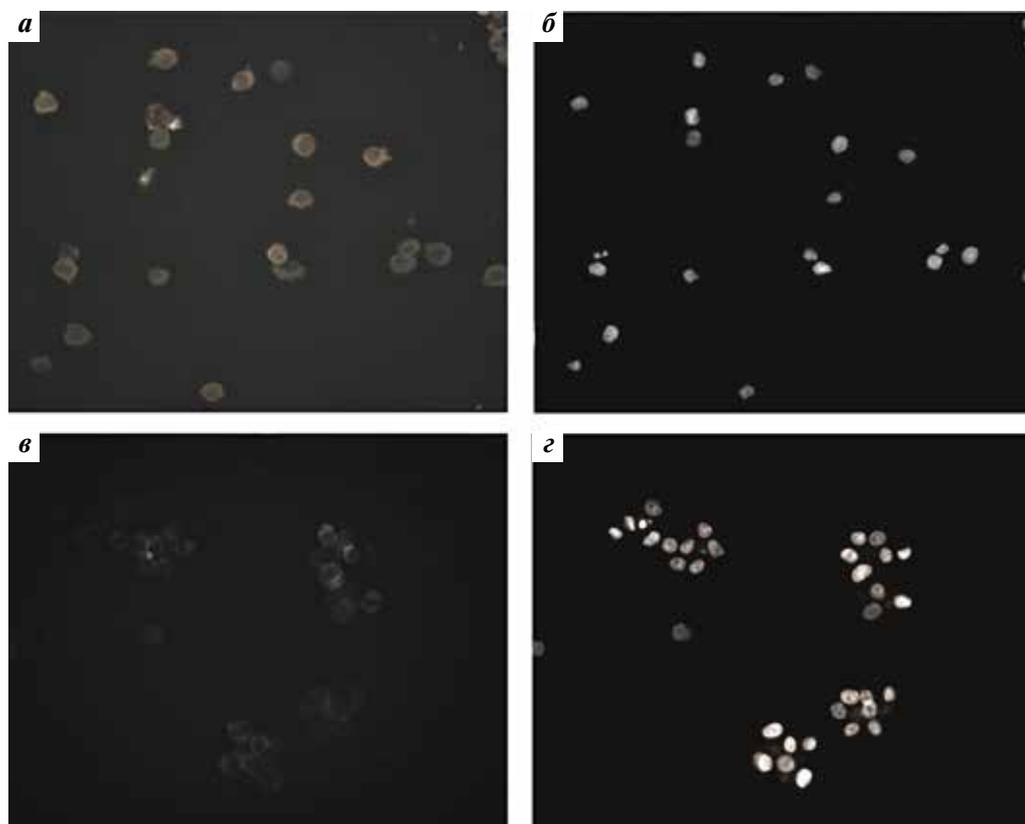


Рис. 5. Локализация белка YB-1 в опухолевых клетках NCI-H929 и NCI-H929/btz-6: а – клетки NCI-H929, белок YB-1; б – ядра клеток NCI-H929, окрашенные Hoechst; в – клетки NCI-H929/btz-6, белок YB-1; г – ядра клеток NCI-H929/btz-6, окрашенные Hoechst
Fig. 5. YB-1 protein localization in NCI-H929 and NCI-H929/btz-6 tumor cells: а – NCI-H929 cells, YB-1 protein; б – NCI-H929 cell nuclei stained with Hoechst; в – NCI-H929/btz-6 cells, YB-1 protein; г – NCI-H929/btz-6 cell nuclei stained with Hoechst

у пациентов с ММ. Так, в одной из работ показано, что высокая экспрессия гена *MVP* обнаружена в 73 % образцов ММ и ассоциирована с меньшей общей выживаемостью у первичных больных ММ, получавших полихимиотерапию с бортезомибом [14]. В другом исследовании продемонстрировано, что экспрессия белка *MVP* обнаруживалась значительно реже – в 12,5 % из 72 образцов ММ, и была одинаковой у больных с предшествующей терапией и без нее [15]. Также есть работа, в которой авторы показали, что *MVP* является предиктором плохого ответа на химиотерапию и прогноз у пациентов с раком яичников [16], тогда как в другой работе не было найдено никакой взаимосвязи между экспрессией *MVP* и клиническими данными [17].

Белок YB-1 является фактором транскрипции для генов *MDR1*, *MRP1* и *MVP* в некоторых культурах. Однако в линии RPMI8226/btz-6, где наблюдается перемещение небольшой части белка YB-1 в ядра клеток, увеличивается только экспрессия гена *MVP*. Мы полагаем, что для данной культуры активация генов *MDR1* и *MRP1* идет или не через YB-1, или дополнительно подавляется бортезомибом через путь NF- κ B [12]. Однако активация экспрессии *MVP* все-таки может быть связана с транслокацией белка YB-1 в ядра клеток. Есть исследование, в котором продемонстрирована тесная корреляция ядерной экспрессии YB-1

с экспрессией *MVP* при раке яичника и раке толстой кишки, а также показано, что экспрессия *MVP* в первичной опухоли яичника является неблагоприятным прогностическим фактором в отношении выживаемости больных без лечения [18].

В-третьих, в нашей работе показано, что экспрессия гена *BCRP* увеличивалась в обеих резистентных сублиниях, также в этих сублиниях наблюдали повышение устойчивости к доксорубину. Мы полагаем, что устойчивость к доксорубину, по-видимому, связана с повышением экспрессии этого белка. Это важно, так как в схемах лечения больных ММ часто применяется доксорубин [2]. Однако существует работа, в которой авторы не наблюдали увеличения устойчивости к доксорубину на сходных клеточных моделях [19]. Авторы данной статьи вели устойчивые к бортезомибу сублинии в условиях, отличных от наших, а именно культивировали клетки в среде с повышенным содержанием сыворотки (15 %), возможно, этим объясняется различие в чувствительности к доксорубину нашей и их сублиний.

В литературе рассматривается несколько механизмов возникновения устойчивости к бортезомибу. Так, обнаружены мутации в β 5-субъединице протеасомы, с которой связывают повышенную устойчивость к бортезомибу, однако в клинической практике данные мутации встречаются редко [20]. Также длительное

действие бортезомиба приводит к повышению экспрессии $\beta 5$ -субъединицы в резистентных сублиниях, а также к снижению экспрессии каспазы 3, т.е. к ингибированию апоптоза [19]. Кроме этого, сейчас в исследованиях большое внимание уделено отбору определенных популяций под действием бортезомиба, например side population [21] и популяций с измененным иммунофенотипом [22].

Заключение

Таким образом, активация ABC-транспортеров не является ключевым механизмом формирования лекарственной устойчивости к бортезомибу. Некоторую роль может играть белок MVP, а повышение экспрессии BCRP объясняет возникновение устойчивости к доксорубину, но не к бортезомибу, так как последний не является субстратом BCRP.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Бессмельцев С.С. Множественная миелома (патогенез, клиника, диагностика, дифференциальный диагноз). Клиническая онкогематология 2013;6(3):237–57. [Bessmaltsev S.S. Multiple myeloma(pathogenesis, clinic, diagnosis, differential diagnosis). Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical Oncohematology 2013;6(3):237–57. (In Russ.)].
2. Moreau P., San Miguel J., Sonneveld P. et al. Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol 2017;28(suppl 4):iv52–61. DOI: 10.1093/annonc/mdx096. PMID: 28453614.
3. Ставровская А.А., Генс Г.П. Некоторые новые аспекты исследований множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток. Успехи молекулярной онкологии 2014;(1):5–11. [Stavrovskaya A.A., Gens G.P. Some new aspects of the study of multidrug resistance of tumor cells. Espekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2014;(1):5–11. (In Russ.)].
4. Robey R., Pluchino K., Hall M. et al. Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer. Nat Rev Cancer 2018;18(7):452–64. DOI: 10.1038/s41568-018-0005-8. PMID: 29643473.
5. Елисеева И.А., Ким Е.Р., Гурьянов С.Г. и др. Y-бокс-связывающий белок 1 (YB-1) и его функции. Успехи биологической химии 2011;51:65–132. [Eliseeva I.A., Kim E.R., Guryanov S.G. et al. Boxing BINDING PROTEIN 1 (YB-1) and its functions. Uspekhi biologicheskoy khimii = Advances in Biological Chemistry 2011;51:65–132. (In Russ.)].
6. 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. DOI: 10.1042/bj20121323. PMID: 23216250.
7. Stein U., Jurchott K., Walthers W. et al. Hyperthermia-induced nuclear translocation of transcription factor YB-1 leads to enhanced expression of multidrug resistance-related ABC transporters. J Biol Chem 2001;276(30):28562–9. DOI: 10.1074/jbc.m100311200. PMID: 11369762.
8. 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. DOI: 10.1038/sj.onc.1208386. PMID: 15750632.
9. Wiberg K., Carlson K., Aleskog A. et al. *In vitro* activity of bortezomib in cultures of patient tumour cells-potential utility in haematological malignancies. Med Oncol 2009;26(2):193–201. DOI: 10.1007/s12032-008-9107-6. PMID: 19016012.
10. Панищева Л.А., Каклакова Е.С., Рыбалкина Е.Ю., Ставровская А.А. Влияние протеасомного ингибитора бортезомиба на экспрессию генов множественной лекарственной устойчивости и активность киназы. Биохимия 2011;76(9):1238–47. [Panishcheva L.A., Kakrakova E.S., Rybalkina E.Yu., Stavrovskaya A.A. Effect of the proteasome inhibitor bortezomib on gene expression of multidrug resistance and kinase activity. Biokhimiya = Biochemistry 2011;76(9):1238–47. (In Russ.)].
11. Scheffer G.L., Schroeijers A.B., Izquierdo M.A. et al. Lung resistance-related protein/major vault protein and vaults in multidrug-resistant cancer. Curr Opin Oncol 2000;12(6):550–6. DOI: 10.1097/00001622-200011000-00007. PMID: 11085454.
12. Wang H., Wang X., Li Y. et al. The proteasome inhibitor bortezomib reverses P-glycoprotein-mediated leukemia multidrug resistance through the NF-kappaB pathway. Pharmazie 2012;67(2):187–92. PMID: 22512091.
13. Hu Y., Wang L., Wang L. et al. Preferential cytotoxicity of bortezomib toward highly malignant human liposarcoma cells via suppression of MDR1 expression and function. Toxicol Appl Pharmacol 2015;283(1):1–8. DOI: 10.1016/j.taap.2014.12.015. PMID: 25576094.
14. Черных Ю.Б., Голенков А.К., Шушанов С.С. Влияние экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости на клиническое течение множественной миеломы. Альманах клинической медицины 2016;44(5):624–30. [Chernykh Yu.B., Golentov A.K., Shushanov S.S. The effect of gene expression of multidrug resistance on the clinical course of multiple myeloma. Al'manakh klinicheskoy meditsiny = Almanac of Clinical Medicine 2016;44(5):624–30. (In Russ.)].
15. Schwarzenbach H. Expression of MDR1/P-glycoprotein, the multidrug resistance protein MRP, and the lung-resistance protein LRP in multiple myeloma. Medical Oncology 2002;19(2):87–104. DOI: 10.1385/mo:19:2:87. PMID: 11085454.
16. Izquierdo M.A., van der Zee A.G., Vermorken J.B. et al. Drug resistance-associated marker Lrp for prediction of response to chemotherapy and prognoses in advanced ovarian carcinoma. J Natl Cancer Inst 1995;87(16):1230–7. DOI: 10.1093/jnci/87.16.1230. PMID: 7563169.
17. Arts H.J., Katsaros D., de Vries E.G. et al. Drug resistance-associated markers P-glycoprotein, multidrug resistance-associated protein 1, multidrug resistance-associated protein 2, and lung resistance protein as prognostic factors in ovarian carcinoma. Clin Cancer Res 1999;5(10):2798–805. PMID: 10537344.
18. Oda Y., Ohishi Y., Basaki Y. et al. Prognostic implications of the nuclear localization of Y-box-binding protein-1 and CXCR4 expression in ovarian cancer: their correlation with activated Akt, LRP/MVP and P-glycoprotein expression. Cancer Sci 2007;98(7):1020–6. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2007.00492.x. PMID: 17459055.
19. Balsas P., Galán-Malo P., Marzo I. et al. Bortezomib resistance in a myeloma cell line is associated to PSM $\beta 5$ overexpression and polyploidy. Leuk Res 2012;36(2):212–8. DOI: 10.1016/j.leukres.2011.09.011. PMID: 21978467.
20. Franke N.E., Kaspers G.L., Berg N. et al. Acquired resistance to bortezomib in human RPMI8226 multiple myeloma cells: molecular characterization, cross-

resistance with other proteasome inhibitors but marked sensitization to glucocorticoids. *Blood* 2008;112:2640.

21. Kim K.H., Cheong H.J., Lee M.Y. et al. Bortezomib is more effective to side population of RPMI8226 myeloma cells

than classical anti-myeloma agents. *Anticancer Res* 2019;39(1):127–33. DOI: 10.21873/anticancerres.13088. PMID: 30591449.

22. Park J., Bae E.K. Lee C. et al. Establishment and characterization

of bortezomib-resistant U266 cell line: constitutive activation of NF- κ B-mediated cell signals and/or alterations of ubiquitylation-related genes reduce bortezomib-induced apoptosis. *BMB Rep* 2014;47(5):274–9. PMID: 24286313.

Благодарность. Коллектив авторов выражает большую признательность к.б.н. Е.Ю. Рыбалкиной и к.б.н. Н.Н. Калитину за ценные советы при подготовке статьи.

Acknowledgment. Authors express special thanks to E. Yu. Rybalkina, Ph. D. and N. N. Kalitin, Ph. D. for valuable advice during the preparation of the article.

Вклад авторов

Л.А. Лалетина: разработка дизайна исследования, получение данных для анализа, анализ полученных данных, обзор публикаций по теме статьи, написание текста рукописи;

Н.И. Моисеева: разработка дизайна исследования, получение данных для анализа, анализ полученных данных, написание текста рукописи;

Д.А. Климова: получение данных для анализа;

А.А. Ставровская: обзор публикаций по теме статьи.

Authors' contributions

L.A. Laletina: developing the research design, obtaining data for analysis, analysis of the obtained data, reviewing of publications of the article's theme, article writing;

N.I. Moiseeva: developing the research design, obtaining data for analysis, analysis of the obtained data, article writing;

D.A. Klimova: obtaining data for analysis;

A.A. Stavrovskaya: reviewing of publications of the article's theme.

ORCID авторов/ORCID of authors

Л.А. Лалетина/L.A. Laletina: <https://orcid.org/0000-0002-8839-5881>

Н.И. Моисеева/N.I. Moiseeva: <https://orcid.org/0000-0001-6697-7154>

Д.А. Климова/D.A. Klimova: <https://orcid.org/0000-0001-6241-1866>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант мол_а № 18-315-00075). **Financing.** The study was performed with the support of the Russian Foundation for Basic Research (grant мол_а No. 18-315-00075).

Статья поступила: 20.02.2019. **Принята к публикации:** 11.03.2019.

Article received: 20.02.2019. **Accepted for publication:** 11.03.2019.