

Е.Ю. Рыбалкина¹, Т.П. Стромская¹, Л.П. Овчинников², А.А. Ставровская¹

СВЯЗЬ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ БЕЛКА YB-1 В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК ОПУХОЛЕЙ ЧЕЛОВЕКА С МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ

¹ ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва,

² ФГБУН Институт белка РАН, Пущино, Московская область

Многофункциональный белок млекопитающих YB-1 вовлечен во многие ДНК- и РНК-зависимые события в клетке и регулирует экспрессию генов на различных уровнях. Ранее было показано, что присутствие в тканях некоторых опухолей клеток с локализацией YB-1 в ядре является неблагоприятным прогностическим признаком и маркирует множественную лекарственную устойчивость опухолей, связанную в первую очередь с активностью Р-гликопротеина (ABCB1) [1]. В данной работе мы исследовали, как белок YB-1 влияет на экспрессию генов, кодирующих ABC транспортеры и на лекарственную устойчивость в нескольких линиях клеток, в которых исходно не был экспрессирован ген *MDR1*, кодирующий Р-гликопротеин. Эти популяции значительно различались по содержанию мРНК YB-1 и по характеру внутриклеточной локализации белка YB-1. Однако инкубация клеток всех исследованных популяций в культуральной среде с сывороткой после их голодания приводила к транслокации YB-1 в ядра клеток. С повышением количества клеток с ядерной локализацией YB-1 коррелировало повышенное количество мРНК гена YB-1. Обработка клеток препаратом LY-294,002, ингибитором PI3K/Akt зависимого пути, препятствовала транслокации белка YB-1 в ядра клеток, при этом клетки становились более чувствительными к токсическому действию. Таким образом, обнаружено, что сигнальные пути, вовлеченные в контроль пролиферации клеток, в частности, сигнальный каскад PI3K/Akt, вовлечены в контроль внутриклеточной локализации YB-1 в популяциях клеток рака яичника, меланомы и рака предстательной железы человека. В этих клетках ядерная локализация YB-1 коррелирует с экспрессией генов МЛУ и MRP1 DCRP и с чувствительностью клеток к ряду лекарственных препаратов.

Ключевые слова: опухолевые клетки, множественная лекарственная устойчивость, YB-1, ABC транспортеры

Многофункциональный белок YB-1 является членом семейства ДНК и РНК-связывающих белков с эволюционно консервативным доменом холодового шока. Белок YB-1 принимает участие во многих ДНК- и мРНК-зависимых процессах [2,3,11]. Этот белок обнаруживается как в ядре, так и в цитоплазме клеток млекопитающих. Функционируя в качестве фактора транскрипции в ядре, YB-1 регулирует в клетке экспрессию целого ряда генов, в том числе, генов множественной лекарственной устойчивости *MDR1* и *LRP* [2,3,11]. В различных злокачественных опухолях (молочной железы, легкого, яичников, остеосаркомах и некоторых других) может быть повышено количество клеток, в которых YB-1 локализован в ядрах, по сравнению с нормальными тканями. Было обнаружено, что такое повышение коррелирует с неблагоприятным течением заболевания и резистентностью опухолей к химиотерапии [5,9,10,13]. Локализацию YB-1 в ядрах малигнизированных клеток было предложено рассматривать в качестве маркера множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) злокачественных новообразований [12]. Однако этот тест не стал универсальным показателем МЛУ клеток опухолей. Остается необходимым тщательный анализ и оценка внутриклеточной локализации YB-1 в разных опухолевых популяциях. В основном влияние YB-1 на МЛУ связывали с активацией под его воздействием гена *MDR1* и кодируемого этим геном Р-гликопротеина (Pgp) [11,13]. Неясным остается вопрос, какие еще защитные механизмы клетки активируются под влиянием YB-1. В данной работе мы использовали 3 линии опухолевых клеток, в которых не экспрессирован ген *MDR1*, с целью выяснить, связаны ли между собой характер внутриклеточной локализации YB-1 и активация генов других транспортных белков семейства ABC, к которому принадлежит Pgp (ABCB1). Исследована чувствительность клеточных линий к препаратам разных классов – винкаалкалоиду винбластину и противоопухолевому антибиотику антрациклинового ряда доксорубину. Мы использовали культуры клеток опухолей разного гистогенеза для того, чтобы

понять, характерны ли выявляемые закономерности для разных новообразований.

Материал и методика

Культивирование клеток В работе использованы следующие культивируемые клеточные линии человека: линия опухоли яичника CaOV-3 [14], линия меланомы mS [16] и линия клеток рака предстательной железы PC3 [15]. Условия культивирования клеток описаны ранее [1].

Использованы следующие препараты: доксорубин (Leiras, Финляндия), винбластин (Рихтер, Венгрия), LY-294,002 (Sigma, США).

Имуноцитохимическое определение внутриклеточной локализации YB-1.

Для определения внутриклеточной локализации YB-1 клетки выращивали в чашках Петри диаметром 35 мм на фрагментах покровных стекол, фиксировали раствором 4% параформальдегида на фосфатном буфере pH 7,4 (PBS), промывали трехкратно буфером PBS и нарушали целостность клеточной мембраны 0,1% раствором Triton-X100. Затем клетки инкубировали с кроличьими поликлональными анти-YB-1 антителами (АТ), полученными из лаборатории Л.П. Овчинникова (Институт белка РАН). После инкубации с первыми АТ клетки промывали 3 раза PBS. Затем клетки инкубировали со вторыми анти-кроличьими FITC-меченными АТ. Используя флуоресцентный микроскоп (Zeiss, Германия), проводили подсчет числа клеток с цитоплазматической и ядерной локализацией YB-1.

Выделение РНК и ОТ-ПЦР. Выделение тотальной РНК из клеток осуществляли при помощи TRI Reagent ("MRC", США) в соответствии с протоколом производителя. Для реакции обратной транскрипции использовали гексонуклеотидные праймеры. Амплификацию исследуемых генов проводили с соответствующими специфическими праймерами, на приборе Терцик (фирмы "ДНК-технология"), в качестве внутреннего контроля оценивали экспрессию гена домашнего хозяйства *GAPDH*. Последовательности праймеров приведены в работе А.В. Ваймана [1]. Условия проведения амплификации: 94°C – 30 с; 94°C – 10 с, 60°C – 10 с, 72°C – 10 с; 1 мин при 72°C. Амплификацию гена *GAPDH* проводили при 25 циклах, *YB-1* – при 28, *BCRP* – при 31, *MRP1* – при 28 циклах. Продукты ОТ-ПЦР разделяли в 2%-ном агарозном геле.

Оценка чувствительности клеток к доксорубину, винбластину. Перед рассевом в 96 луночные планшеты клетки 24 ч инкубировали во флаконах на бессывороточной среде. Затем рассевали в 96-луночный планшет по 5 х 10³ клеток на лунку в 100 мкл культуральной среды с сывороткой с добавлением исследуемых препаратов: доксорубина или винбластина, и культивировали 3 суток при 37°C, 5% CO₂. В опытах по исследованию действия LY-294,002, в культуральную среду добавляли LY-294,002 до конечной концентрации 10 мкМ. После инкубации в каждую лунку добавляли по 20 мкл раствора МТТ "Sigma" (5 мг/мл МТТ в фосфатном буфере pH 7.4) и инкубировали 2 ч при 37°C. Затем из лунок удаляли всю среду и к клеткам добавляли DMSO ("ПанЭко", Россия) по 60 мкл на лунку, перемешивали 15 мин. Анализ проводили на спектрофотометре Multiscan ("Пикон", Россия) при длине волны 590 нм. Все опыты повторяли 2–4 раза.

Результаты

В работе использованы три культивируемые линии опухолей человека, разного гистогенеза, различающиеся по числу клеток

с ядерной локализацией YB-1: линия клеток рака яичника CaOV-3, меланомы mS и рака предстательной железы PC3 (рис. 1б, 2б, 3б контроль). Сравнение линий клеток опухолей человека показало, что в популяциях клеток встречается 3 типа клеток: а) клетки, в которых YB-1 выявляется антителами только в ядре и отсутствует в цитоплазме; б) клетки, в которых YB-1 отсутствует в ядре и выявляется только в цитоплазме; в) клетки, в которых YB-1 выявляется как в ядре, так и в цитоплазме. В последнем случае мы обозначили распределение YB-1 как «диффузное». В линии CaOV-3 в 40% клеток популяции белок YB-1 обнаруживается только в ядрах, в 30% клеток только в цитоплазме, 30% клеток имеет диффузный характер окраски. Таким образом,

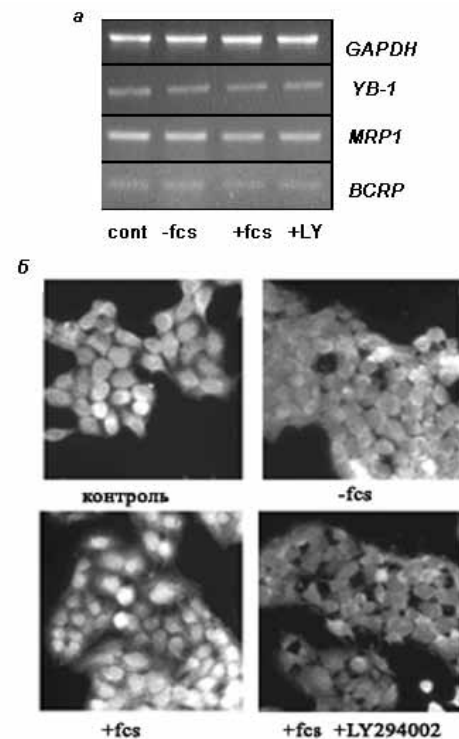


Рис. 1. Влияние изменений содержания сыворотки в культуральной среде на экспрессию гена YB-1 и генов MRP1 и BCRP (а) и на внутриклеточную локализацию белка YB-1 (б) в клетках опухоли яичника CaOV-3.

а. Результаты ОТ-ПЦР

б. Иммуногистохимическое окрашивание культур клеток антителами к белку YB-1.

–fcs — клетки переведены в среду без сыворотки на 24 часа
+fcs — к клеткам, культивировавшимся в бессывороточной среде, добавлено 10% сыворотки на 6 часов.

+LY — в бессывороточную среду добавляли 10% сыворотки и LY294,002 10 мкМ на 6 часов Fig.1

Effects of the alterations of serum content in culture medium upon the expression of YB-1, MRP1 and BCRP genes (a.) and on the intracellular localization of YB-1 protein in the population of the cell line CaOV-3 (ovary tumor)(б).

а. RT-PCR analysis

б. Indirect Immunohistochemistry. YB-1 antibodies.

–fcs — cells were propagated without serum for 24 h

+fcs — 10% of fcs was added to cultures for 6 h after propagation without serum for 24 h

+LY — 10% of fcs and LY294,002 10mcM were added to cultures for 6 h

в этой популяции преобладает ядерная локализация YB-1 (70% клеток) (рис.1б, контроль). В линии mS преобладают клетки с локализацией YB-1 в цитоплазме (рис.2б, контроль). Для популяции клеток рака простаты PC3 характерно диффузное окрашивание подавляющего большинства клеток антителами к YB-1, т.е. этот белок локализован как в ядре, так и в цитоплазме (рис.3б, контроль). Диффузное распределение белка может означать, что в данном типе клеток белок может осуществлять более разнообразные функции.

Эти три вида клеток были исследованы на содержание мРНК гена *YB-1* и генов семейства *ABC* транспортеров *MRP1* и *BCRP*, обеспечивающих МЛЮ. Клетки всех исследованных линий экспрессировали *YB-1*. Содержание мРНК

генов МЛЮ различалось: клетки mS хорошо экспрессировали гены *MRP1* и *BCRP* (рис.2а), а клетки CaOV-3 и PC3 хорошо экспрессировали ген *MRP1*, но слабо *BCRP* (рис.1а, 3а). Во всех линиях клеток нам не удалось выявить мРНК гена *MDR1*. Таким образом, разнообразие экспрессии генов МЛЮ в выбранных линиях клеток является удобным для изучения вопросов координированных изменений экспрессии гена *YB-1*, локализации белка YB-1 и лекарственной устойчивости опухолевых клеток. Мы попытались исследовать связь между внутриклеточной локализацией YB-1 и МЛЮ. Известно, что активация сигнального пути PI3K/Akt приводит к фосфорилированию YB-1 и может способствовать его перемещению из цитоплазмы в ядро [17]. Используя ингибитор LY-294,002, мы

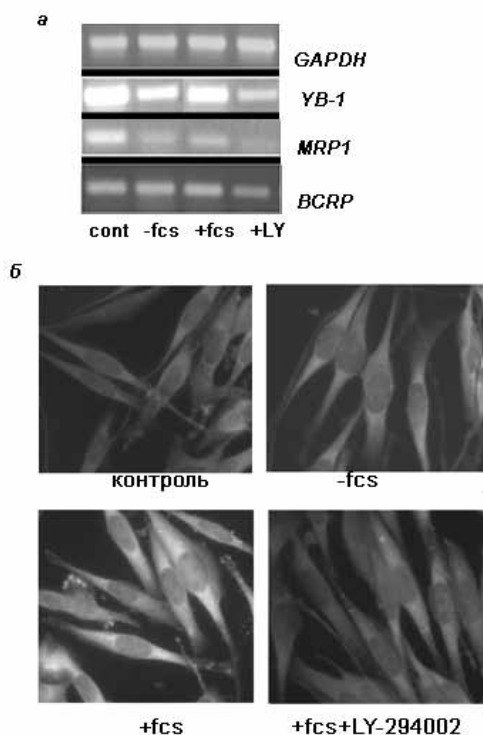


Рис.2. Влияние изменений содержания сыворотки в культуральной среде на экспрессию гена YB-1 и генов MRP1 и BCRP (а) и на внутриклеточную локализацию белка YB-1 (б) в клетках меланомы человека mS.

а. Результаты ОТ-ПЦР

б. Иммуногистохимическое окрашивание культур клеток антителами к белку YB-1.

-fcs — клетки переведены в среду без сыворотки на 24 часа
+fcs — к клеткам, культивировавшимся в бессывороточной среде, добавлено 10% сыворотки на 6 часов.

+LY — в бессывороточную среду добавляли 10% сыворотки и LY294,002 10мкМ на 6 часов Fig.2

Effects of the alterations of serum content in culture medium upon the expression of YB-1, MRP1 and BCRP genes (a.) and on the intracellular localization of YB-1 protein in the population of the cell line mS (melanoma) (b).

а. RT-PCR analysis

б. Indirect Immunohistochemistry. YB-1 antibodies.

-fcs — cells were propagated without serum for 24 h

+fcs — 10% of fcs was added to cultures for 6 h after propagation without serum for 24 h

+LY — 10% of fcs and LY294,002 10mкM were added to cultures for 6 h

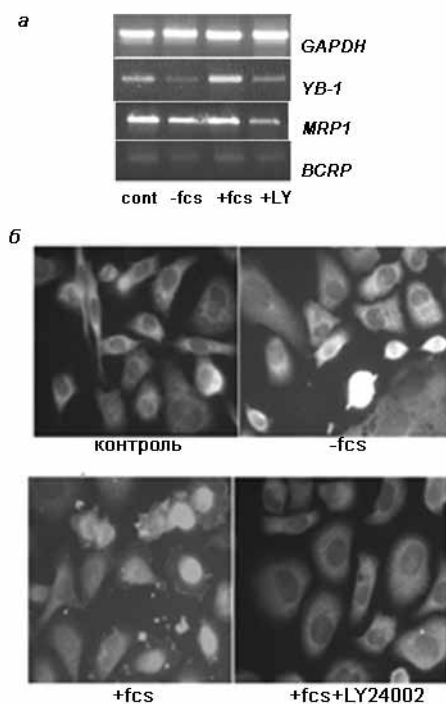


Рис.3. Влияние изменений содержания сыворотки в культуральной среде на экспрессию гена YB-1 и генов MRP1 и BCRP (а) и на внутриклеточную локализацию белка YB-1 (б) в клетках аденокарциномы простаты PC3.

а. Результаты ОТ-ПЦР

б. Иммуногистохимическое окрашивание культур клеток антителами к белку YB-1.

-fcs — клетки переведены в среду без сыворотки на 24 часа
+fcs — к клеткам, культивировавшимся в бессывороточной среде, добавлено 10% сыворотки на 6 часов.

+LY — в бессывороточную среду добавляли 10% сыворотки и LY294,002 10мкМ на 6 часов Fig.3

Effects of the alterations of serum content in culture medium upon the expression of YB-1, MRP1 and BCRP genes (a.) and on the intracellular localization of YB-1 protein in the population of the cell line PC3 (prostate cancer) (b).

а. RT-PCR analysis

б. Indirect Immunohistochemistry. YB-1 antibodies.

-fcs — cells were propagated without serum for 24 h

+fcs — 10% of fcs was added to cultures for 6 h after propagation without serum for 24 h

+LY — 10% of fcs and LY294,002 10mкM were added to cultures for 6 h

исследовали возможное влияние сигнального пути PI3K/Akt на внутриклеточную транслокацию YB-1 и экспрессию генов *YB-1* и генов, ответственных за МЛЮ, и устойчивость клеток к цитотоксическим препаратам.

Для того чтобы исследовать связь активации сигнального каскада PI3K/Akt и статуса YB-1, мы исследовали внутриклеточную локализацию этого белка в клетках в условиях сывороточного голодания и последующего перевода клеток в среду с сывороткой, что является традиционным способом активации PI3R/Akt сигнального пути.

Во всех исследованных нами клеточных линиях картина распределения YB-1 между цитоплазмой и ядром изменялась сходным образом: после сывороточного голодания в течение 24 ч в клетках наблюдали только цитоплазматическую локализацию YB-1; через 3-6 ч после помещения клеток в среду с 10% сыворотки YB-1 выявляется уже и в ядрах клеток, через 24 ч культивирования в среде с сывороткой картина распределения YB-1 в клетках соответствовала контролю.

В клетках CaOV-3 ингибитор LY-294,002, добавленный в присутствии сыворотки, препятствовал транслокации YB-1 в ядро (рис.1б). При обработке клеток CaOV-3 ингибитором LY-294,002 количество мРНК *YB-1* не изменялось, и заметно не изменялось количество мРНК генов МЛЮ (рис. 1а). При этом чувствительность к цитотоксическому действию доксорубина не изменилась, но чувствительность к винбластину становилась выше (таблица).

Таблица Подобные опыты с ингибитором LY-294,002 на клетках mS показали следующее. LY-294,002 снижал количество мРНК *YB-1* и генов МЛЮ *MRP1* и *BCRP* (рис.2а). Чувствительность к цитостатикам повысилась после обработки клеток ингибитором почти в два раза. Как и в случае с клетками CaOV-3 после суточного голодания и последующего пребывания в среде с 10% сыворотки в клетках наблюдали ядерную локализацию YB-1. Ингибитор LY-294,002 препятствовал транслокации YB-1 в ядро (рис.2б). Что касается клеток линии простаты человека PC3, то ранее нами было показано, что ингибитор Akt LY-294,002 подавляет фосфорилирование Akt в этих клетках [4]. Для клеток PC3 характерен диффузный характер окраски антителами против YB-1. Добавление 10% сыворотки приводило к перемещению YB-1 из цитоплазмы в ядро. Добавление ингибитора LY-294, препятствовало сывороточной стимуляции транслокации YB-1 в ядро (рис.3б). При инкубации с LY-294,002 в клетках также снижается количество мРНК YB-1 и *MRP1* (рис. 3а) и в 2 раза повышается чувствительность клеток PC3 к доксорубину и винбластину.

Изменение чувствительности клеток к цитостатикам при добавлении LY-294,002

Название линий клеток	Препараты	[LD50] М* при культивировании	
		в чистой среде	в среде с 10мкМ LY-294,002
CaOV-3	Доксорубин	2,3±0,3 x 10 ⁻⁶	2,2±0,4 x 10 ⁻⁶
	Винбластин	7,1±0,6 x 10 ⁻⁹	3,5 ±0,5 x 10 ⁻⁹
PC3	Доксорубин	5,3±0,7 x 10 ⁻⁶	2,5± 0,3 x 10 ⁻⁶
	Винбластин	10,1±0,4 x 10 ⁻⁸	6,0± 0,7 x 10 ⁻⁸
mS	Доксорубин	2,5± 0,5 x 10 ⁻⁷	1,5± 0,3 x 10 ⁻⁷
	Винбластин	4,8± 0,6 x 10 ⁻⁹	2,0± 0,7 x 10 ⁻⁹

*[LD50] М – значение концентрации вещества в М при которой наблюдается гибель 50% клеток.

Обсуждение

В данной работе мы исследовали, как белок YB-1 влияет на экспрессию генов, кодирующих ABC транспортеры, и на лекарственную устойчивость в нескольких линиях клеток, в которых исходно ген *MDR1* был экспрессирован так слабо, что мРНК *MDR1* не определялась.

Анализ популяций опухолевых клеток показал, что при оценке окраски клеток антителами к YB-1 следует выделить 3 типа окраски, характеризующие локализацию YB-1 в клетках: ядерную, цитоплазматическую и ядерно-цитоплазматическую «диффузную». В более ранних работах, в которых исследовали внутриклеточную локализацию YB-1, клетки с диффузным окрашиванием не выделяли, хотя, судя по иллюстрациям, такие клетки в препаратах встречались [8]. Между тем, при диффузном распределении белка YB-1 он может осуществлять более разнообразные функции, и выделение таких клеток представляется необходимым.

Наши результаты показывают, что сигнальные пути, вовлеченные в контроль пролиферации клеток, в частности, сигнальный каскад PI3K/Akt/PTEN, вовлечены в контроль внутриклеточной локализации YB-1 в популяциях клеток рака яичника, рака предстательной железы и меланомы. Ранее на клетках рака молочной железы было показано, что фосфорилирование YB-1 киназой Akt может влиять на характер внутриклеточной локализации этого белка [17]. По-видимому, этот феномен характерен для опухолевых клеток разных типов гистогене-

за. Нужно подчеркнуть, что активность YB-1 может быть связана не только с сигнальным путем PI3K/Akt/PTEN, но и с другими путями, контролирующими клеточную пролиферацию. Было показано, что в регуляции гена VEGF-A трансфактором YB-1 участвует сигнальный каскад ERK/MAPK [7]. Данные относительно того, что активность PI3K/Akt влияет на внутриклеточную локализацию YB-1 и экспрессию генов МЛУ в 2-х из 7-ми культур клеток опухолей яичника, были опубликованы ранее группой японских исследователей [6]. Результаты этих исследователей показывают, что добавление сыворотки и активация Akt приводят к перемещению YB-1 в ядра клеток, а применение ингибиторов Akt препятствуют этому перемещению. Однако мы наблюдали транслокацию YB-1 под влиянием сыворотки в популяциях клеток CaOV-3, mS и PC3 при более длительном культивировании, чем эти исследователи наблюдали в клетках SCOV3. Вероятно, молекулярные механизмы транслокации YB-1 в ответ на сывороточную стимуляцию в разных клетках — разные. Ингибитор сигнального пути PI3K/Akt LY-294,002 в наших опытах, блокировал перемещение YB-1 в ядра клеток. Таким образом, этот сигнальный путь участвовал в контроле внутриклеточного перемещения YB-1 в опухолевых клетках разной тканевой принадлежности. Можно полагать, что PI3K/Akt-зависимая транслокация YB-1 в исследованных нами клетках потребовала включения еще каких-то дополнительных механизмов по сравнению с клетками, исследованными в работе [6]. Каковы эти механизмы должны показать дальнейшие исследования.

В клетках линий mS и PC3 имеет место координированное снижение количества мРНК YB-1 и гена МЛУ MRP1 при добавлении LY-294,002. В клетках рака яичника CaOV-3 мы не наблюдали изменения транскрипции генов YB-1 и MRP1. В работе Basaki и соавт. [6] было показано, что в клетках рака яичника SCOV3 при использовании малых шпилечных РНК к YB-1 снижение экспрессии гена YB-1 сопровождалось повышением экспрессии гена MDR1. Очевидно, PI3K/Akt-зависимое изменение транскрипции генов разных ABC транспортеров в высокой степени зависит от клеточного контекста, а не от тканевой принадлежности опухолевых клеток.

Во всех 3 исследованных линиях клеток добавление LY-294,002 препятствует транслокации YB-1 из цитоплазмы в ядро при сывороточной стимуляции и это сопровождается повышением чувствительности клеток к цитостатикам. Результаты, полученные в данной работе, показывают, что различия в локализации YB-1 в популяциях

опухолевых клеток коррелируют с изменениями устойчивости этих клеток к лекарственным препаратам. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что сигнальный путь PI3K/Akt вовлечен в контроль внутриклеточной локализации YB-1 в клетках. Перспективными представляются исследования возможности изменения фенотипа МЛУ опухолевых клеток путем изменения содержания YB-1 в клетке.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты №07-04-00720 и №11-034-00504а).

ЛИТЕРАТУРА

1. Вайман А.В., Стромская Т.П., Рыбалкина Е.Ю. др. Содержание и локализация белка YB-1 в опухолевых клетках с множественной лекарственной устойчивостью // Биохимия. — 2006. — Т. 71. — С. 190-200.
2. Елисеева И.А., Ким Е.Р., Гурьянов С.Г. и др. Y-бокс, связывающий белок (YB-1) и его функции // Успехи биол. химии. — 2001. — Т. 51. — С. 65-132.
3. Скабкин М.А., Скабкина О.В., Рыбалкина Е.Ю. и др. Мультифункциональные белки с доменом холодового шока в регуляции экспрессии генов // Успехи биол. химии. — 2001. — Т. 44. — С. 3-52.
4. Щербакова Е.А., Стромская Т.П., Рыбалкина Е.Ю. и др. Роль белка PTEN в формировании множественной лекарственной устойчивости клеток рака предстательной железы // Молекул. биол. — 2008. — Т. 42. — С. 1-7.
5. Bargou R.C., Jurchott 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. — Vol. 3. — P. 447-450.
6. Bazaki Y., Hosoi F., Oda Y. et al. Akt-dependent nuclear localization of Akt-dependent nuclear localization of Y-box-binding protein 1 in acquisition of malignant characteristics by human ovarian cancer cells // Oncogene. — 2007. — Vol. 26. — P. 2736-2746.
7. Coles L.S., Lambrusco L., Burrows J. et al. Phosphorylation of cold shock domain/ y-box proteins by ERK2 and GSK3 beta and repression of the human VEGF promoter // FEBS Lett. — 2005. — Vol. 579. — P. 5372-5378.
8. Fujita T., Ito K., Izumi H. et al. Increased nuclear localization of transcription factor Y-box binding protein 1 accompanied by up-regulation of P-glycoprotein in breast cancer pretreated with paclitaxel // Clin Cancer. — 2005. — Vol. 11. — P. 8837-8844.
9. Gessner C., Woischwill C., Schumacher F. et al. Nuclear YB-1 expression as a negative prognostic marker in nonsmall cell lung cancer // Europ. Respir J. — 2004. — Vol. 23. — P. 14-19.
10. Huang J., Tan P.H., Li R.B. et al. Y-box binding protein, YB-1, as a marker of tumor aggressiveness and response to adjuvant chemotherapy in breast cancer // Int. J. Oncol. — 2005. — Vol. 26. — P. 607-613.
11. Kohno K., Izumi H., Uchiumi T. et al. The pleiotropic functions of the Y-box-binding protein YB-1 // Bioessay. — 2003. — Vol. 25. — P. 691-698.
12. 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. – Vol. 3. – P. 1485-1492.
13. Matsumoto K., Bay B.H. Significance of the Y-box binding proteins in human cancers // *J. Molec. Genetic. Medicine.* – 2005. – Vol. 1. – P. 11-17.
 14. Sinna G.A., Beckman G., Lundgren E. et al. Characterization of two new human ovarian carcinoma cell lines // *Gynecol. Oncol.* – 1979. – Vol. 7. – P. 267-280.
 15. Stone K.R., Mickey D.D., Wunderli H. et al. Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145) // *Int. J. Cancer.* – 1978. – Vol. 21. – P. 274-281.
 16. Stromskaya T.P., Filippova N.A., Rybalkina E. Yu. Et al. Alteration of melanin synthesis in human melanoma cell selected in vitro for multidrug resistance // *Exp. Toxic. Pathol.* – 1995. – Vol. 47. – P. 157-166.
 17. PSutherland BW, Kucab JE, Wu J. et al. Akt phosphorylates the -box binding protein-1 at Ser 102 located in the cold shock domain and affects the anchorage-independent growth of breast cancer cells // *Oncogene.* – 2002. – Vol. 24. – P. 4281-4292.

*E.Yu.Rybalkina¹⁾, T.P.Stromskaya¹⁾, L.P.Ovchinnikov²⁾,
A.A.Stavrovskaya¹⁾*

Connection of intracellular protein YB-1 localization in cell cultures of human tumors with multidrug resistance

1)N.N.Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow
2)Research Institute of Protein, Pushchino, Moscow Region

In this study, we investigated how the protein YB-1 influenced on the expression of genes coding ABC transporters and on drug resistance in several cell lines, in which originally gene MDR1, coding P-glycoprotein, was not expressed. These populations were significantly different in the presence of mRNA YB-1 and the nature of the intracellular localization of the protein YB-1. However incubation of cells in all studied populations in the culture medium with serum after starvation led to translocation of YB-1 in the cell nucleus. The increase of the number of cells with nuclear localization of YB-1 correlated with increased amount of mRNA YB-1. Processing of cells with drug LY-294,002 by PI3K/Akt inhibitor prevented the translocation of the protein YB-1 into the nuclei of cells, and the cells became more sensitive to the toxic action. Thus, we observed that the signaling pathways involved in control of cell proliferation, in particular a signaling cascade PI3K/Akt were involved in the control of the intracellular localization of YB-1 in cell populations of ovarian cancer, melanoma and human prostate cancer. In these cells the nuclear localization of YB-1 correlated with an expression of MDR and MRP1 DCRP genes and with a sensitivity of cells to a number of drugs.

Поступила в редакцию 05.08. 2013