

Картирование протеома лизата линии опухолевых клеток MCF-7 для идентификации потенциальных маркеров рака молочной железы

В.Е. Шевченко, М.А. Таипов, С.В. Ковалев, Н.Е. Арноцкая,
О.М. Павлова, И.А. Кудрявцев, З.Н. Никифорова
ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Контакты: Марат Азатович Таипов martaip@rambler.ru

Проведено масс-спектрометрическое картирование протеома лизата линии опухолевых клеток MCF-7. В результате идентифицированы 153 белка с молекулярным весом от 5000 до 630 000 Да, значительную часть которых составили цитоплазматические и ядерные белки. На долю последних пришлось 60 % от общего числа, тогда как доля внеклеточных и мембранных белков составила 13 %. После применения нескольких критериев отбора для анализа полученных данных в работе представлен список из 31 потенциального биомаркера и описано 12 перспективных мишеней для таргетной терапии рака молочной железы.

Ключевые слова: рак молочной железы, линия опухолевых клеток MCF-7, протеомика, масс-спектрометрия, биомаркеры, мишени для таргетной терапии

Mapping of proteomic lysate of a MCF-7 cancer cell line for the identification of potential markers for breast cancer

V.E. Shevchenko, M.A. Taipov, S.V. Kovalev, N.E. Arnotskaya,
O.M. Pavlova, I.A. Kudryavtsev, Z.N. Nikiforova

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Mass spectrometric mapping of proteomic lysate of a MCF-7 cancer cell line was carried out, which identified 153 proteins having molecular weights of 5000 to 630000 Da, a high proportion of which was cytoplasmic and nuclear proteins. The latter accounted for 60 % of their total number whereas the proportion of extracellular and membrane proteins constituted 13 %. After using some selection criteria to analyze the findings, the authors present a list of 31 potential biomarkers and describe 12 promising breast anticancer therapeutic targets.

Key words: breast cancer, MCF-7 cancer cell line, proteomics, mass spectrometry, biomarkers, therapeutic targets

Введение

Рак молочной железы (РМЖ) — самая распространенная форма рака у женщин во всем мире с четко выраженной тенденцией к росту числа больных. Ежегодно РМЖ заболевают около 1 млн 200 тыс. и погибают около 600 тыс. женщин в возрасте от 15 до 44 лет [1]. При этом около 25 % больных впервые обращаются за лечебной помощью с III стадией болезни или с местнораспространенным заболеванием. В случае если опухоль ограничена пределами молочной железы, 5-летняя выживаемость составляет около 97 %, при наличии метастазов РМЖ на момент постановки диагноза — лишь 23 % [2]. Высокая смертность от РМЖ связана с поздней диагностикой метастазов опухоли в различные органы и частыми случаями рецидивирования заболевания. В связи с этим особый интерес представляют протеомные маркеры опухолевого роста, которые можно обнаружить и идентифицировать в плазме крови на доклинической стадии заболевания и применять для диагностики и мониторинга течения РМЖ. Использование биомаркеров может оказать существенное влияние на показатели выживаемости при РМЖ.

В настоящее время в клинической практике применяется ряд протеомных маркеров РМЖ: рецепторы эстрогенов, прогестерона, эпидермального фактора роста, тирозинкиназный рецептор *Her-2/neu* [3], СА 15-3 [4], однако они не обладают достаточной чувствительностью и специфичностью для диагностики ранних доклинических форм и прогноза метастазирования опухоли в различные органы. В связи с этим постоянно ведется поиск комплексов биомаркеров для диагностики и прогноза РМЖ [5].

Масс-спектрометрия (МС) широко используется для обнаружения и идентификации протеомных маркеров в биологических жидкостях, опухолевой ткани, лизатах и секретах линий опухолевых клеток [6, 7]. В данной работе применялись МС-методы [8] и экспериментальная модельная система — культура клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7. Модельные клеточные системы достаточно широко распространены в протеомных исследованиях [9] и удобны тем, что позволяют получать и анализировать чистые протеомы и секреты опухолевых клеток человека [10].

В этом исследовании мы представили данные по картированию протеома лизата линии опухолевых клеток MCF-7. В результате проведенного исследования секвенированы 153 белка, часть из которых была обнаружена и описана ранее, в том числе некоторые протеины, предложенные в качестве потенциальных серологических биомаркеров РМЖ. После использования нескольких критериев отбора полученных данных и различных протеомных и геномных баз (Swiss-Prot, Gene Ontology, Plasma Proteome Database, G2SBC Database) нами были предложены ряд потенциальных биомаркеров опухолевого роста и новые перспективные мишени для таргетной терапии РМЖ.

Материалы и методы

Методика работы с культурой клеток

В исследовании применяли эстрогенпозитивную культуру клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 из коллекции клеточных культур ИИЦ РАН: ATCC CRL 1500; ECACC 87012601. Клетки культивировали при 37 °C в увлажненной атмосфере с 5 % CO₂ в среде DMEM с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) и гентамицина (50 мкг/мл). Клетки отмывали 3 раза в 5 мл PBS (забуференный фосфатом физиологический раствор) и лизировали в 0,5 мл PBS с добавлением 5 мкл коктейля ингибиторов протеаз (Sigma) и замораживанием в жидком азоте. Измерение концентрации белка в лизатах осуществляли на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, США) с помощью программы NanoDrop ND-1000 по методу Бредфорд.

МС-анализ

Трипсинолиз каждой фракции проводили по методике с трифторэтанолом [8]. Для анализа триптических пептидов каждой фракции применяли нанопоточный хроматограф Ultimate 3000 (Dionex), соединенный с источником ионов NanoESI масс-спектрометра вы-

сокого разрешения LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific). Полученные данные анализировали с помощью программного пакета Thermo Proteome Discoverer 1.0 Build 43 (Thermo Scientific). Для идентификации белков использовали поисковую программу Mascot Server 2.2.06 (Matrix Science) с базой NCBI nr release 20100121 [11].

Результаты

Картирование протеома лизата линии опухолевых клеток MCF-7

При анализе лизата линии опухолевых клеток MCF-7 идентифицированы с высокой достоверностью 153 белка с молекулярным весом от 5000 до 630 000 Да, в том числе 52 протеина с массой < 30 кДа, 89 — 30–100 кДа, 10 — 100–300 кДа, 1 — 300–500 и 1 — > 500 кДа. Доля покрытия анализируемых белков изменялась от 0 до 82 %, из них 98 белков — с покрытием до 20 %, 36 — 21–40 %, 13 — 41–60 %, 9 — 61–82 %. Суммарная интенсивность ионов пептидов, отвечающая секвенированным белкам, изменялась от 5,20 E + 05 до 2,37 E + 10, т. е. составляла практически 5 порядков.

Клеточная локализация идентифицированных протеинов

Каждый протеин классифицировался в соответствии с его клеточной локализацией на основании информации, доступной в открытых базах данных Swiss-Prot, Gene Ontology (GO) и др. Если один белок находился более чем в одном клеточном компартменте, это также учитывалось. Основная часть идентифицированных протеинов относилась к цитоплазматическим (41 %) и ядерным (19 %), доля внеклеточных и мембранных белков составила 13 % (рис. 1).

Биологическая роль идентифицированных протеинов в клетке

Протеины картировали по биологической роли в клетке, молекулярной функции (рис. 2) и функциональному классу в соответствии с протеомно-геном-

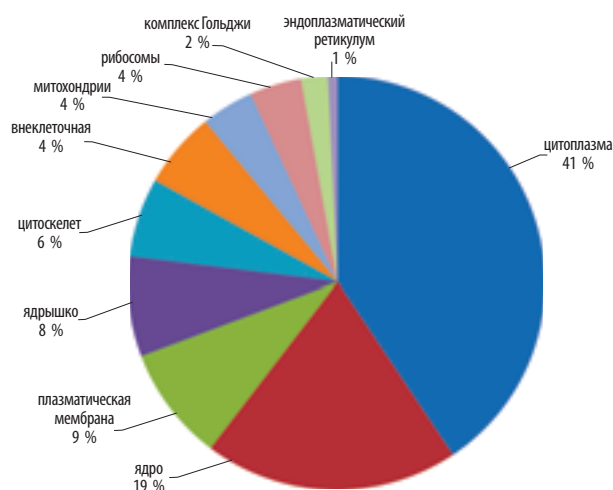


Рис. 1. Субклеточная локализация белков (%), идентифицированных в лизате линии опухолевых клеток MCF-7

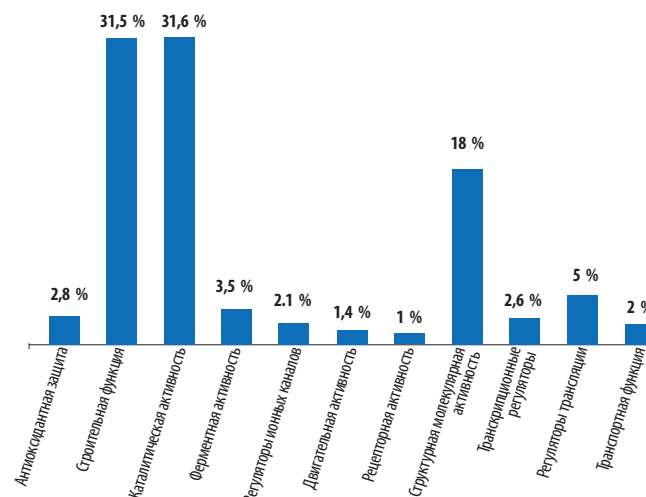


Рис. 2. График распределения белков (%), обнаруженных в лизате линии опухолевых клеток MCF-7, по их молекулярной функции в клетке

ной аналитической программой PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships, www.pantherdb.org). PANTHER — уникальный ресурс, классифицирующий гены и молекулы белков в зависимости от их биологической роли в клетке. Программа анализирует молекулярные функции протеинов с использованием известных баз генов и белков Swiss-Prot, Gene Ontology. По сравнению с GO система классификации белков PANTHER обеспечивает более упрощенную онтологию специфических белковых функций и классифицирует больше белков [12].

Анализ 153 протеинов показал, что в протеоме лизата опухолевых клеток линии MCF-7 преобладают белки, контролирующие метаболизм, — 84 (58,3 %), далее следуют регуляторы различных процессов: внутриклеточных — 42 (29,2 %); иммунных — 28 (18,8 %); роста и развития — 23 (16 %); системных — 13 (9 %); энергетических — 5 (3,5 %); ответа на стресс — 19 (13,2 %), клеточного цикла — 13 (9 %), апоптоза — 5 (3,5 %), деления — 3 (2,1 %), адгезии — 1 (0,7 %), белки межклеточных контактов — 21 (14,6 %), внутриклеточных компонентов — 20 (13,9 %) и транспортные белки — 18 (11,8 %).

Дифференциальный анализ белков по молекулярным классам в программе PANTHER продемонстрировал следующие результаты: число протеинов, участвующих в синтезе нуклеиновых кислот, составило 17 (11,8 %); шаперонов — 16 (11,1 %); оксидоредуктаз — 12 (8,3 %); трансфераз — 12 (8,3 %); структурных протеинов — 11 (7,6 %); белков цитоскелета — 6 (4,2 %); изомераз — 6 (4,2 %); сигнальных молекул — 5 (3,5 %); транспортных протеинов — 5 (3,5 %); ферментов-модуляторов — 4 (2,8 %); транскрипционных факторов — 4 (2,8 %); лиаз — 3 (2,1 %); протеаз — 3 (2,1 %); транспортеров-носителей — 3 (2,1 %); лигаз — 2 (1,4 %); кальцийсвязывающих — 2 (1,4 %); иммунных — 1 (0,7 %); фосфотаз — 1 (0,7 %); мембранных транспортеров — 1 (0,7 %).

При распределении в зависимости от биологической роли в клетке было выявлено, что в лизате преобладают протеины с каталитической (31,6 %), анаболической (31,5 %) и структурно-молекулярной (18 %) активностью (см. рис. 2).

Идентификация потенциальных маркеров РМЖ

Для идентификации потенциальных биомаркеров РМЖ использовали ряд критериев отбора [13], в частности следующие.

- Из полученного списка исключили белки, не являющиеся внеклеточными или мембранными. Таким образом, основное внимание уделялось белкам, которые с большей вероятностью могли появиться в циркуляции и обнаруживаться неинвазивными серологическими методами.

- Проводили сравнение данных с протеомными базами плазмы крови от здоровых доноров. Отмечали

те белки, которые присутствуют в плазме крови и выявляются в лизатах клеток линии MCF-7.

- Учитывали протеины, предложенные ранее в качестве потенциальных маркеров при исследовании сыворотки/плазмы крови больных РМЖ.

- Выделяли белки, связанные, по данным литературы, с патогенезом РМЖ.

С использованием указанных выше критериев отбора была сформирована группа из 31 потенциального биомаркера внеклеточной или мембранной локализации (см. таблицу). В число предложенных маркеров, идентифицированных в протеоме лизата линии MCF-7, вошли белки семейства S100 (A6, A11), ферментный комплекс синтазы жирных кислот (СЖК), кофилин-1, три 90 кДа белка теплового шока, актины — alpha и beta, аннексин A2, фосфоглицераткиназа-1 и др. Анализ 31 белка показал, что 28 из них включены в Plasma Proteome Database и присутствуют в плазме крови.

Для обнаружения протеинов, связанных с патогенезом РМЖ, использовали базу данных Genes-to-Systems Breast Cancer (G2SBC), представляющую многоуровневый биоинформационный ресурс по РМЖ. G2SBC собирает и интегрирует информацию о генах и белках, описанных в литературе и связанных с патогенезом РМЖ [14]. Анализ 31 протеина, выполненный с помощью G2SBC, позволил идентифицировать 15 наиболее вероятных маркеров, ассоциированных с РМЖ, среди которых белки, кодируемые генами *S100A11*, *S100A6*, *PDIA5*, *PFN1*, *PHGDH*, *MIF*, *MYH9*, *ENO1*, *FASN*, *GAPDH*, *GPI*, *SOD1*, *PTGDR*, *TKT*, *PARK7* (см. таблицу). Все эти протеины представляют наибольший интерес в качестве возможных маркеров РМЖ.

Отдельно нами была выделена дополнительная группа потенциальных мишеней для терапии РМЖ, среди которых: ферментный комплекс СЖК, аннексин A2, простагландин-Е-синтаза (ПГЕС), 15-гидроксипростагландин-дегидрогеназа (15-ГПДГ), рецепторы простагландинов E2 (PTGER1, PTGER2, PTGER3) и D2 (PTGDR), лейкотриен-A4-гидролаза (ЛТА₄Г), 14-3-3 (ζ, γ), STAT1.

Обсуждение

В лизате линии опухолевых клеток MCF-7 были секвенированы 153 белка с молекулярным весом от 5000 до 630 000 Да. В результате часть идентифицированных белков совпала с протеинами, обнаруженными ранее, что подтверждает достоверность полученных данных [9, 10]. Особый акцент делался на внеклеточные и мембраносвязанные белки, так как они с наибольшей вероятностью могут циркулировать в кровеносной и лимфатической системе и таким образом служить биомаркерами рака. В таблице представлен список потенциальных маркеров РМЖ,

Таблица потенциальных маркеров и вероятных мишеней для таргетной терапии РМЖ

№	Индекс гена	Название белка	Молекулярный вес, Да	Plasma Proteome Database	G2SBC Data-base
1	<i>ACTA1</i>	Actin, alpha 1, skeletal muscle	42366	+	—
2	<i>ACTBL2</i>	Actin, beta-like 2	42318	+	—
3	<i>ACTN4</i>	Alpha actinin 4	102661	+	—
4	<i>ANXA2</i>	Annexin A2 isoform 2	38808	+	—
5	<i>CFL1</i>	cofilin 1	18719	+	—
6	<i>CTSD</i>	Cathepsin D preproprotein	45037	+	—
7	<i>ENO1</i>	2-phosphopyruvate-hydratase, alpha-enolase	47421	+	+
8	<i>FASN</i>	Fatty acid synthase	275850	+	+
9	<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	36201	+	+
10	<i>GPI</i>	neuroleukin	63377	+	+
11	<i>HSP90AA1</i>	Heat shock 90kDa protein 1, alpha	98652	+	—
12	<i>HSP90B1</i>	90kDa heat shock protein	83584	+	—
13	<i>HSP90B1</i>	Heat shock protein 90kDa beta, member 1 precursor	92696	+	—
14	<i>KRT2</i>	Epidermal cytokeratin 2	66110	+	—
15	<i>LOC51229</i>	Gastric-associated differentially-expressed protein YA61P	14858	—	—
16	<i>MIF</i>	Chain A, Macrophage Migration Inhibitory Factor	12612	+	+
17	<i>MYH9</i>	Myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle	227646	+	+
18	<i>PARK7</i>	Parkinson disease protein 7	20050	+	+
19	<i>PDIA5</i>	Protein disulfide isomerase-related protein 5	46512	+	+
20	<i>PFN1</i>	Profilin 1	15216	+	+
21	<i>PHGDH</i>	3-phosphoglycerate dehydrogenase	24258	+	+
22	<i>PTGER1</i>	Prostaglandin E2 receptor EP1 subtype	275850	+	—
23	<i>PTGER2</i>	Prostaglandin E2 receptor EP2 subtype	70508	—	—
24	<i>PTGER3</i>	Prostaglandin E2 receptor EP3 subtype	165923	+	—
25	<i>S100A11</i>	S100 calcium binding protein A11	11847	+	+
26	<i>S100A6</i>	S100 calcium-binding protein A6	10230	+	+
27	<i>SLC12A1</i>	Solute carrier family 12 (sodium/potassium/chloride transporters), member 2	132048	+	—
28	<i>SOD1</i>	Superoxide dismutase 1, soluble	16154	+	+
29	<i>TAGLN2</i>	Transgelin 2	22548	+	—
30	<i>PTGDR</i>	Prostaglandin D2 receptor	40271	—	+
31	TKT	Transketolase	68435	+	+

классифицированных как внеклеточные и мембрано-связанные на основании базы GO. Из них 28 циркулируют в крови, включены в Plasma Proteome Database и рассматриваются как потенциальные маркеры заболевания. Отдельно выделен и рассмотрен ряд возможных мишеней для терапии РМЖ.

С использованием ресурса G2SBC из 31 белка мы идентифицировали 15 наиболее вероятных биомаркеров, дифференциально экспрессированных в опухолевой ткани РМЖ по сравнению с нормой (см. таблицу). В их числе — СЖК, повышение уровня экспрессии которой в сочетании с высоким пролиферативным индексом ($> 17\%$) в опухолевых клетках коррелирует с неблагоприятным прогнозом для РМЖ [15]. СЖК определяется в плазме крови больных и опухолевой ткани молочной железы и служит потенциальным биомаркером. Ряд авторов рассматривают СЖК также в качестве перспективной потенциальной мишени для таргетной терапии РМЖ [16].

Необходимо отметить группу протеинов, которые циркулируют в крови, вовлечены в процессы опухолевой прогрессии, инвазии и метастазирования. Они представлены в базах Plasma Proteome Database, G2SBC и являются наиболее вероятными маркерами РМЖ. Это S100 (A6, A11) [17, 18], глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД) [19], аннексин A2 [20, 21], супероксид дисмутаза 1 (СОД-1) [22], фактор миграции макрофагов [23, 24]. По данным ряда авторов, белки S100A6 и S100A11 можно использовать в качестве потенциальных биомаркеров для ранней диагностики РМЖ [17, 18]. Анализ уровня экспрессии ГАФД можно применять для оценки метастатической активности клеток РМЖ [19]. Аннексин A2 является регулятором фибринолиза, ангиогенеза, индуктором опухолевого роста, инвазии и метастазирования [20]. Он связан с множественной лекарственной устойчивостью опухолевых клеток, а повышенная экспрессия гена ANX2 в опухолевой ткани ассоциирована с метастазированием и неблагоприятным прогнозом для РМЖ [21]. Предполагают, что аннексин A2 может быть также перспективной мишенью для терапии, направленной на подавление ангиогенеза при РМЖ [25].

Особый интерес представляют белки, которые, по нашему мнению, являются новыми потенциальными мишенями для будущей терапии РМЖ. Среди них рецепторы простагландинов E_2 , D_2 , ПГЕС, 15-ГПДГ, ЛТА₄Г, 14-3-3 (ζ , γ), STAT1. Необходимо отметить, что группа рецепторов простагландинов E_2 и ферменты ПГЕС, 15-ГПДГ, ЛТА₄Г не включены в базу G2SBC, однако недавние исследования указывают на их участие в патогенезе РМЖ.

С метастазированием РМЖ многие исследователи связывают ПГЕС, увеличение уровня экспрессии которой обнаружено в высоко-метастатических опухолевых клетках РМЖ. Экспрессия этого фермента регу-

лируется эстрогенами и их рецепторами, цитокинами, фактором некроза опухоли- α и интерлейкином-1 β . ПГЕС контролирует синтез простагландина E_2 (ПГЕ₂), участвующего в молекулярных механизмах метастазирования РМЖ [26].

Известно, что ПГЕ₂ играет важную роль в прогрессии РМЖ, а его синтез контролируется ферментами циклооксигеназой-2 (ЦОГ-2) и 15-ГПДГ. ПГЕ₂ действует через 4 типа рецепторов: EP_1 (увеличение уровня внутриклеточного кальция), EP_2 и EP_4 (активация аденилатциклазы) и EP_3 (снижение активности аденилатциклазы и увеличение тока ионов кальция в клетку). Рецепторы ПГЕ₂ (субтипы EP_1 , EP_2 , EP_3) связаны с регуляцией метастазирования РМЖ. В ряде исследований выявлено увеличение уровня ПГЕ₂ и экспрессии рецепторов EP_1 , EP_2 , EP_3 в высокометастатических линиях РМЖ по сравнению с таковыми в низкометастатической линии MCF-7. Также установлено, что ПГЕ₂ регулирует миграцию и инвазию опухолевых клеток. На основании этого можно отнести группу рецепторов ПГЕ₂ к мишеням для таргетной терапии и потенциальным маркерам метастазирования РМЖ [27].

Рецептор простагландина D_2 (ПГД₂) является негативным регулятором метастатической активности клеток РМЖ. В свою очередь, снижение уровня ПГД₂ в клетках РМЖ приводит к прогрессии опухолевого процесса, активации ангиогенеза и сопровождается аномальным ростом сосудов в опухоли. Дефицит ПГД₂ усиливает ангиогенез и проницаемость сосудов для ЦОГ-2 и ПГЕ₂, а повышение уровня ПГД₂ и экспрессии его рецепторов тормозит ангиогенную активность опухоли. ПГД₂ действует через PGDR2-рецепторы, ингибирует TGF- β 1 индуцированный эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) клеток [28] и запускает процесс возврата клеток к эпителиальному фенотипу. Таким образом, ПГД₂ и его рецепторы являются негативными регуляторами ангиогенеза, метастазирования и опухолевой прогрессии и могут служить потенциальными мишенями для терапии РМЖ [29].

Фермент 15-ГПДГ является антагонистом ЦОГ-2, супрессором опухолевого роста и может модулировать эстрогензависимый сигнальный путь. Низкая экспрессия 15-ГПДГ сопровождается повышением уровня ЦОГ-2, активацией ЭМП и усилением инвазивных свойств опухоли [30]. Обнаружена четкая корреляция низкой экспрессии 15-ГПДГ с негативным прогнозом для РМЖ [31]. 15-ГПДГ также влияет на чувствительность опухолевых клеток к химиотерапевтическим препаратам. В одном из исследований [32] показано, что блокаторы гена 15-PGDH вызывают ослабление противоопухолевого антипролиферативного эффекта нестероидных противовоспалительных препаратов. Противоопухолевый эффект индукторов 15-ГПДГ в эксперименте возрастал при одновременном применении авастина, ингибитора ангиогенеза.

Химиотерапевтический эффект, вызванный целекоксибом, зависит от 15-ГПДГ. Установлено, что снижение уровня экспрессии 15-ГПДГ придает устойчивость опухолевым клеткам к селективным ингибиторам ЦОГ-2. Таким образом, 15-ГПДГ является перспективным прогностическим маркером и мишенью для терапии РМЖ.

В ряде работ зарегистрирована повышенная экспрессия ЛТА₄Г в клетках РМЖ по сравнению с нормой [33]. В экспериментах на животных продемонстрировано, что ингибиторы ЛТА₄Г способны подавлять опухолевую прогрессию [34]. Нарушение баланса ЛТА₄Г играет важную роль в канцерогенезе, так как этот фермент регулирует каскад важных сигнальных путей в клетке, обладает ростстимулирующим эффектом и усиливает пролиферацию эпителиальных клеток. Кроме того, отмечен паракринный пролиферативный эффект ЛТА₄Г, способствующий делению предраковых и раковых клеток. Ингибиторы или антагонисты рецепторов ЛТА₄Г могут быть использованы отдельно или в комбинации с другими препаратами (например, с ингибиторами ЦОГ-2) для профилактики и лечения РМЖ [35].

Из группы потенциальных мишеней для терапии РМЖ определенный интерес представляют белки семейства 14-3-3 (ζ, γ), STAT1 — регуляторы различных сигнальных путей в клетке.

Протеин 14-3-3 ζ регулирует механизмы клеточной адгезии, блокирует апоптоз опухолевых клеток [36] и связан с регуляцией ЭМП клеток [37]. Обнаружено, что уровень экспрессии этого белка возрастает при РМЖ [38]. Гиперэкспрессия 14-3-3 ζ связана с высоким риском развития рецидива рака у оперированных больных РМЖ. Протеин 14-3-3 ζ служит важным узлом в сети митогенных сигналов и приводит к росту злокачественной опухоли молочной железы [39].

14-3-3 γ участвует в регуляции клеточного цикла и механизмов активации апоптоза [40] и является негативным регулятором p53. Экспериментально доказа-

но, что уровень экспрессии белка 14-3-3 γ достоверно возрастает при немелкоклеточном раке легкого [41]. Этот протеин является онкогеном и регулирует активацию сигнальных путей MAPK и PI3K [42], играющих важную роль в 14-3-3 γ-опосредованной индукции опухолевых клеток. Таким образом, протеин 14-3-3 γ можно рассматривать в качестве потенциальной мишени для будущей терапии рака.

STAT1 служит преобразователем сигнала в цитоплазме и транскрипционным активатором в ядре, активируется рядом внеклеточных сигнальных белков, таких как цитокины, факторы роста и гормоны. STAT1 имеет большое значение в регуляции нормальных физиологических клеточных процессов, таких как деление, пролиферация, апоптоз и ангиогенез. Экспрессия STAT1 снижается в опухолевых клетках молочной железы [43] и коррелирует с повышенным уровнем экспрессии рецепторов эпидермального фактора роста и онкогена *src* [44]. STAT1 — индуктор апоптоза [45, 46] и негативный регулятор ангиогенеза, прогрессии, метастазирования РМЖ [47]. Таким образом, протеин STAT1 можно рассматривать в качестве мишени для терапии рака.

Заключение

В результате проведенного картирования протеома лизата линии опухолевых клеток MCF-7 предложен комплекс из 15 наиболее вероятных маркеров и выявлено 12 потенциальных мишеней для будущей терапии РМЖ. Планируется валидировать в сыворотке/плазме все идентифицированные в ходе работы маркеры РМЖ с помощью ELISA и других количественных методов на больших группах больных. В случае успешной валидации предложенный комплекс биомаркеров будет использован в диагностике ранних доклинических форм заболевания, прогнозе метастазирования, анализе эффективности противоопухолевой терапии и предсказании рецидивов РМЖ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Curado M.P., Edwards B., Shin H.R. et al. Cancer incidence in five continents. Vol. IX. IARC Scientific Publications No. 160. Lyon: IARC, 2007.
2. Schedin P., Borges V. Breaking down barriers: the importance of the stromal microenvironment in acquiring invasiveness in young women's breast cancer. *Breast Cancer Res* 2009;11(2):102.
3. Wang Y.-C., Morrison G., Gillihan R. et al. Different mechanisms for resistance to trastuzumab versus lapatinib in HER2-positive breast cancers — role of estrogen receptor and HER2 reactivation. *Breast Cancer Res* 2011;13(6):121.
4. Ali H.R., Dawson S.-J., Blows F.M. et al. Cancer stem cell markers in breast cancer: pathological, clinical and prognostic significance. *Breast Cancer Res* 2011;13(6):118.
5. Kang U.-B., Ahn Y., Lee J.W. et al. Differential profiling of breast cancer plasma proteome by isotope-coded affinity tagging method reveals biotinidase as a breast cancer biomarker. *BMC Cancer* 2010;10(114):2–9.
6. Шевченко В.Е., Арноцкая Н.Е., Таипов М.А. и др. Масс-спектрометрическое профилирование низкомолекулярного протеома плазмы крови для обнаружения потенциальных маркеров рака молочной железы. *Вестн ПОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН* 2011;22(3):27–33.
7. Shevchenko V.E., Arnotskaya N.E., Zaridze D.G. Detection of lung cancer using plasma protein profiling by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Eur J Mass Spectrom* 2010;16(4):539–49.
8. Шевченко В.Е. Современные масс-спектрометрические методы в ранней диагностике рака. *Масс-спектрометрия* 2004;1(2):103–26.
9. Sarvaiya H.A., Yoon J.H., Lazar I.M. Proteome profile of the MCF7 cancer cell line: a mass spectrometric evaluation.

Rapid Commun Mass Spectrom
2006;20(20):3039–55.

10. Chuthapisith S., Layfield R., Kerr I.D. et al. Proteomic profiling of MCF-7 breast cancer cells with chemoresistance to different types of anti-cancer drugs. *Int J Oncol* 2007;30:1545–51.
11. Шевченко В.Е., Ковалев С.В., Юрченко В.А. и др. Картирование протеома плазмы крови человека в норме и при светлоклеточном раке почки. *Онкоурология* 2011;(3):65–9.
12. Mi H., Guo N., Kejariala A., Thomas P.D. PANTHER version 6: protein sequence and function evolution data with expanded representation of biological pathways. *Nucleic Acids Res* 2007;35:247–52.
13. Kuk C., Kulasingam V., Diamandis E.P. Mining the ovarian cancer ascites proteome for potential ovarian cancer biomarkers. *Mol Cell Proteom* 2009;8(4):661–9.
14. Mosca E., Alfieri R., Merelli I. et al. A multilevel data integration resource for breast cancer study. *BMC Syst Biol* 2010;4:76.
15. Alo P.L., Visca P., Trombetta G. et al. Fatty acid synthase (FAS) predictive strength in poorly differentiated early breast carcinomas. *Tumori* 1999;85:35–40.
16. Jin Q., Yuan L.X., Boulbes D. et al. Fatty acid synthase phosphorylation: a novel therapeutic target in HER2-overexpressing breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2010;12:96.
17. Desai K.V., Simmons J.L., Fargiano A. et al. S100A6 as a biomarker in human breast cancer. *Proc Am Assoc Cancer Res* 2005;46:448.
18. Liu X.G., Wang X.P., Li W.F. et al. Ca²⁺-binding protein S100A11: a novel diagnostic marker for breast carcinoma. *Oncol Rep* 2010;23(5):1301–8.
19. Rvillion F., Pawlowski V., Hornez L., Peyrat J.P. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression in human breast cancer. *Eur J Cancer* 2000;36(8):1038–42.
20. Zhang F., Zhang L., Zhang B. et al. Anxa2 plays a critical role in enhanced invasiveness of the multidrug resistant human breast cancer cells. *J Proteome Res* 2009;8(11):5041–7.
21. Sharma M.R., Koltowski L., Ownbey R.T. et al. Angiogenesis-associated protein annexin A II in breast cancer: selective expression in invasive breast cancer and contribution to tumor invasion and progression. *Exp Mol Pathol* 2006;81(2):146–56.
22. Hays A.P., Naini A., He C.Z., Mitumoto H., Rowland L.P. Sporadic amyotrophic lateral sclerosis and breast

- cancer: Hyaline conglomerate inclusions lead to identification of SOD1 mutation. *J Neurol Sci* 2006;242(1–2):67–9.
23. Lue H., Thiele M., Franz J. et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) promotes cell survival by activation of the Akt pathway and role for CSN5/JAB1 in the control of autocrine MIF activity MIF regulates cell survival through Akt and JAB1. *Oncogene* 2007;26:5046–59.
24. Verjans E., Noetzel E., Bektas N. et al. Dual role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human breast cancer. *BMC Cancer* 2009;9:230.
25. Sharma M., Ownbey R.T., Sharma M.C. Breast cancer cell surface annexin II induces cell migration and neoangiogenesis via tPA dependent plasmin generation. *Exp Mol Pathol* 2010;88(2):278–86.
26. Fraser J., Weaver A.E., Pradhan M., Mehta K. Synergistic up-regulation of prostaglandin E synthase expression in breast cancer cells by 17 beta-estradiol and proinflammatory cytokines. *Endocrinology* 2008;149(12):6272–9.
27. Timoshenko A.V., Xu G., Chakrabarti S. et al. Role of prostaglandin E2 receptors in migration of murine and human breast cancer cells. *Exp Cell Res* 2003;289(2):265–74.
28. Zhang A., Dong Z., Yang T. Prostaglandin D2 inhibits TGF-beta 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition in MDCK cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;291:1332–42.
29. Murata T., Lin M.I., Aritake K. et al. Role of prostaglandin D2 receptor DP as a suppressor of tumor hyperpermeability and angiogenesis in vivo. *PNAS* 2008;105(50):20009–14.
30. Wolf I., O'Kelly J., Rubinek T. et al. 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase is a tumor suppressor of human breast cancer. *Cancer Res* 2006;66:7818–23.
31. Lehtinen L., Vainio P., Wikman H. et al. 15-Hydroxy-prostaglandin dehydrogenase associates with poor prognosis in breast cancer, induces epithelial-mesenchymal transition, and promotes cell migration in cultured breast cancer cells. *J Pathol* 2012;226(4):674–86.
32. Na H.-K., Park J.-M., Lee H.G. et al. 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase as a novel molecular target for cancer chemoprevention and therapy. *Biochem Pharmacol* 2011;82:1352–60.
33. Lai T.-C., Chou H.-C., Chen Y.-W. et al. Secretomic and proteomic analysis of potential breast cancer markers by two-dimensional differential gel electrophoresis. *J Proteome Res* 2010;9(3):1302–22.
34. Chen X., Li N., Wang S. et al. Effects

- of raloxifene after tamoxifen on breast and endometrial tumor growth in athymic mice. *J Natl Cancer Inst* 2002;95(4):1053–61.
35. Chen X., Wang S., Wu N., Yang C.S. Leukotriene A4 hydrolase as a target for cancer prevention and therapy. *Curr Cancer Drug Targ* 2004;4(3):267–83.
36. Niemantsverdriet M., Wagner K., Visser M., Backendorf. C. Cellular functions of 14-3-3 zeta in apoptosis and cell adhesion emphasize its oncogenic character oncogenic properties of 14-3-3 dzeta. *Oncogene* 2008;27:1315–9.
37. Lu J. 14-3-3 dzeta mediated Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) contributes to ErbB2 overexpressing Ductal Carcinoma in Situ (DCIS) progression in to invasive breast cancer. The University of Texas Graduate School of Biomedical Sciences at Houston, 2008. P. 185.
38. George D.C. 14-3-3 dzeta overexpression in early stage breast disease and tumor progression. The University of Texas Graduate School of Biomedical Sciences at Houston, 2007. P. 129.
39. Neal C.L., Xu J., Li P. et al. Overexpression of 14-3-3 dzeta in cancer cells activates PI3K via binding the p85 regulatory subunit. *Oncogene* 2012;31:897–906.
40. Qi W., Liu X., Chen W. et al. Overexpression of 14-3-3 γ causes polyploidization in H322 lung cancer cells. *Mol Carcinogen* 2007;46(10):847–56.
41. Jin Y.H., Kim Y.J., Kim D.W. et al. Sirt2 interacts with 14-3-3 beta/gamma and down-regulates the activity of p53. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;368:690–5.
42. Radhakrishnan V.M., Martinez J.D. 14-3-3 γ induces oncogenic transformation by stimulating MAP kinase and PI3K signaling. *PLoS ONE*;5(7):11433.
43. Leea M.Y., Jounga Y.H., Lima E.J. et al. Phosphorylation and activation of STAT proteins by hypoxia in breast cancer cells. *Breast* 2006;15(2):187–95.
44. Bowman T., Garcia R., Turkson J., Jove R. STATs in oncogenesis. *Oncogene* 2000;19:2474–88.
45. Thomas M., Finnegan C.E., Rogers K.M. et al. STAT1: a modulator of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 2004;64(22):8357–64.
46. Townsend P.A., Scarabelli T.M., Davidson S.M. et al. STAT-1 interacts with p53 to enhance DNA damage-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2004;279(7):5811–20.
47. Huang S., Bucana C.D., Van Arsdall M. et al. Stat1 negatively regulates angiogenesis, tumorigenicity and metastasis of tumor cells. *Oncogene* 2002;21(16):2504–12.