

# Istraživanje patogeneze raka dojke uz pomoć metoda proteomike

## Unveiling the mechanisms of breast cancer pathogenesis by proteomics methods

Ivana Ratkaj<sup>1\*</sup>, Sandra Kraljević Pavelić<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Odjel za biotehnologiju,  
Sveučilište u Rijeci, Rijeka

<sup>2</sup>Institut "Ruđer Bošković",  
Zavod za molekularnu medicinu,  
Laboratorij za sistemsku biomedicinu,  
Zagreb

Primljeno: 16. 10. 2008.

Prihvaćeno: 28. 11. 2008.

**SAŽETAK.** Patogenezu složene i heterogene bolesti kao što je to rak dojke nije moguće u potpunosti razjasniti klasičnim metodološkim pristupima koji su se koristili posljednjih desetljeća u molekularnoj medicini. Osobito je važno otkriti nove biljege koji bi pomogli u ranoj detekciji bolesti te služili za razvoj ciljane terapije. Dosadašnji rezultati iz područja istraživanja raka dojke u kombinaciji s globalnim metodama istraživanja statusa ekspresije gena i proteina pokazali su kako je u patogenezu raka dojke uključen ljudski hormon rasta (hGH) te mehanizmi autokrine regulacije preko proteina Pax-5. Također je identificiran čitav niz novih potencijalnih biomarkera kao što su to HOXA1, CHOP SH3GLB1, kazein kinaze, p53, aneksin XI, CDC25C, eIF-4E i MAP kinaze 7, 14-3-3e, galektin-1, aneksin-5, aneksin-1, LDH-B, GST-pi, aktin, vimentin, HSP70, CK18, moezin, SH3GLB1, SUB1, SND1 i TRIM28, osteopontin i osteonektin.

**Ključne riječi:** molekularna medicina, proteinski profil, proteomika, rak dojke

**ABSTRACT.** Breast cancer is a complex and heterogenic disease. Classical molecular medical approaches cannot be successfully used to completely understand its pathogenesis. In addition, finding new biological markers that would help in early detection and creation of guided and specific therapy is crucial for the future breast cancer management. The results of breast cancer research in combination with those obtained by large scale methods that examine the expression status of genes and proteins, have pointed to an important molecule, namely the human growth hormone (hGH), as a major player in the pathogenesis of breast cancer. It acts through the autocrine regulation system where the activation of Pax-5 gene has been recently confirmed as well. A large number of new biomarkers, like HOXA1, CHOP SH3GLB1, casein kinase, p53, annexin XI, CDC25C, eIF-4E, MAP kinase 7, 14-3-3e, galectin-1, annexin-5, annexin-1, LDH-B, GST-pi, actin, vimentin, HSP70, CK18, moesin, SH3GLB1, SUB1, SND1 i TRIM28, osteopontin and osteonectin, have been recently identified as well.

**Key words:** breast cancer, molecular medicine, protein profile, proteomics

Adresa za dopisivanje:

\* **Mr. sc. Ivana Ratkaj,**  
Odjel za biotehnologiju,  
Sveučilište u Rijeci, 51 000 Rijeka  
e-mail: iratkaj@uniri.hr

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

## UVOD

Rak dojke iznimno je kompleksna i heterogena bolest, kako na histološkoj, tako i na molekularnoj razini te predstavlja najčešće maligno oboljenje žena. Nagomilavanje brojnih i često nepoznatih molekularnih promjena koje vode u gensku nestabilnost, a što potom uzrokuje proliferaciju stanica često rezistentnog ili malignog fenotipa, predstavlja tek kratak opis složenosti nastanka tumora (slika 1). Tradicionalna medicina i postojeće metode liječenja još uvijek ne mogu pružati kvalitetna rješenja za izazove koje donosi ova bolest. Najbolje metode liječenja zahtijevaju ranu detekciju. To znači da tumor još nije iskazao čitav potencijal svoje malignosti i nije metastazirao u druge dijelove tijela (slika 2). Današnje metode liječenja obuhvaćaju kemoterapiju, zračenje, endokrinu ili citotoksičnu terapiju kao i liječenje monoklonalnim protutijelima<sup>1</sup>. Većina ovih metoda nije specifična, zbog čega se uništavaju i zdrave stanice. Jednaki problem predstavlja i činjenica da tumor može postati rezistentan na terapiju. Jedini pravi način za borbu protiv raka dojke, što vrijedi i za sve druge bolesti, bolje je razumijevanje molekularne složenosti patogeneze bolesti. Tek se tada stvaraju preduvjeti za kreiranje novih terapijskih pristupa, stoga je iznimno važno otkriti nove markere koji bi pomogli u ranoj detekciji bolesti i u optimizaciji liječenja koje za cilj ima specifično djelovanje na tumorske stanice. Odgovor molekularne medicine na ovakve zahtjeve danas leži u implementaciji novih metoda koje su sposobne detektirati promjene na razini gena i proteina tumorskih stanica, u istraživanja i kliničku praksu. Metode proteomike i genomike predstavljaju osobito važan iskorak u istraživanju pa-

togeneze bolesti s obzirom da omogućuju istovremeno praćenje profila ekspresije stotina proteina ili gena odjednom. Na taj način moguće je otkriti nove signalne putove koje do sada nismo mogli detektirati klasičnim molekularno-biološkim metodama. Profili ekspresije gena ili proteina mogu pomoći u klasifikaciji tumora, što je izuzetno važno za bolje, primjerenije i učinkovitije liječenje<sup>2</sup>. I dok su genska istraživanja "ograničena" na praćenje razine ekspresije glasničke RNA, gdje jačina ekspresije gena ne mora nužno odgo-

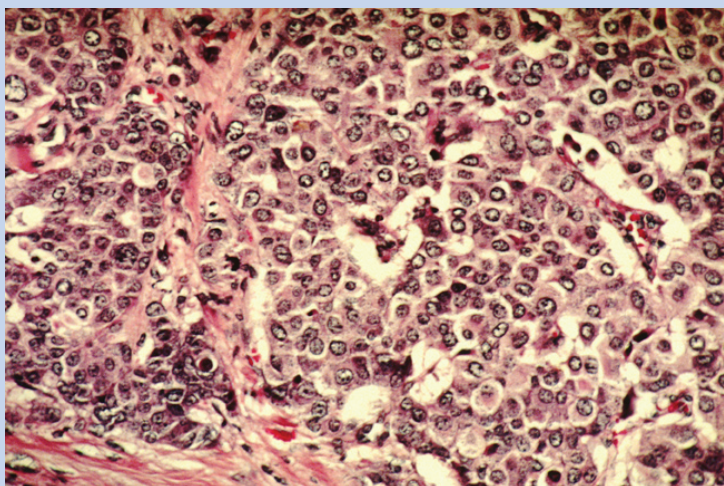
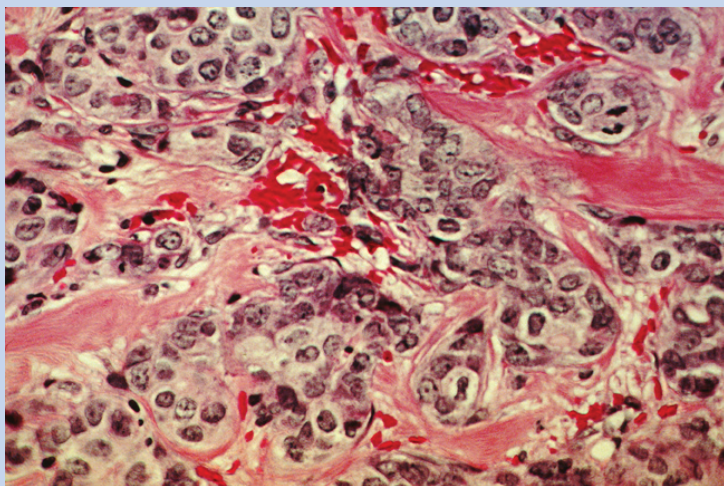
Metode proteomike predstavljaju važan iskorak u istraživanju patogeneze bolesti, a njihova snaga leži u tome što omogućavaju istovremeno praćenje profila ekspresije stotina proteina odjednom. Na taj način moguće je otkriti nove signalne putove koje do sada nije bilo moguće detektirati klasičnim molekularno-biološkim metodama. Primjerice, uz pomoć globalnih proteomskih metoda, u stanicama raka dojke identificiran je čitav niz novih potencijalnih biomarkera.

varati i jačini ekspresije proteina, proteomska istraživanja mogu mnogo lakše otkriti nepoznate mehanizme aktivacije proteina i posttranslacijske promjene koje su direktno odgovorne za fenotip tumorskih stanica i procese koji se u njima zbivaju<sup>3</sup>. Istraživanja patogeneze raka dojke stoga se ne trebaju usmjeriti samo na istraživanja DNA, odnosno razine ekspresije RNA, već se trebaju nadopuniti saznanjima o statusu proteina uz pomoć metoda proteomike. Jedino spoznaje o promjenama na razini gena i proteina mogu doista rasvijetliti svu složenost nastanka tumora. Problem analize rezultata proteomike vezan je, međutim, uz činjenicu da je ekspresija proteina indi-

**Tablica 1.** Prikaz novoidentificiranih proteina i potencijalnih biomarkera dobivenih uz pomoć različitih metoda i pristupa proteomike.

**Table 1.** Newly identified proteins and potential biomarkers obtained by different methods and proteomics approaches.

Metodološki pristup	Identificirani proteini u tkivu tumora dojke - potencijalni biomarkeri
2DE + MALDI-TOF	galektin-1, aneksin-5 i aneksin-1, LDH-B, GST-pi, aktin, vimentin, HSP70, CK18, moezin
Proteinski čip	kazein kinaze, p53, aneksin XI, CDC25C, eIF-4E i MAP kinaza 7, 14-3-3e
iTRAQ ESI-LC/MS/MS	SH3GLB1, SUB1, SND1 i TRIM28
SELDI-TOF	Wdr1, koronin-1A i p34-Arc
ESI-TOF + MALDI TOF	osteopontin, osteonektin, metaloproteinaza-1, aneksin-1



**Slika 1.** Shematski prikaz proliferacije tumorskih stanica i procesa metastaziranja stanica primarnog tumora raka dojke u sekundarne organe.

**Figure 1.** Schematic description of tumor cells proliferation and infiltration of primary tumor cells into secondary organs.

vidualna za svakog pojedinca, specifična za svako pojedino tkivo te je podložna stalnim promjenama u ovisnosti o aktivnosti bolesnika, njegovoj dobi, prehrambenim navikama kao i mnogim drugim parametrima. Posljednjih je godina proveden čitav niz zanimljivih proteomskih istraživanja raka dojke na tkivima, serumu, plazmi, u kojima je otkriven niz novih proteina koji su vezani uz nastanak ove bolesti.

#### GLOBALNE ANALIZE MOLEKULARNIH MEHANIZAMA RAKA DOJKE

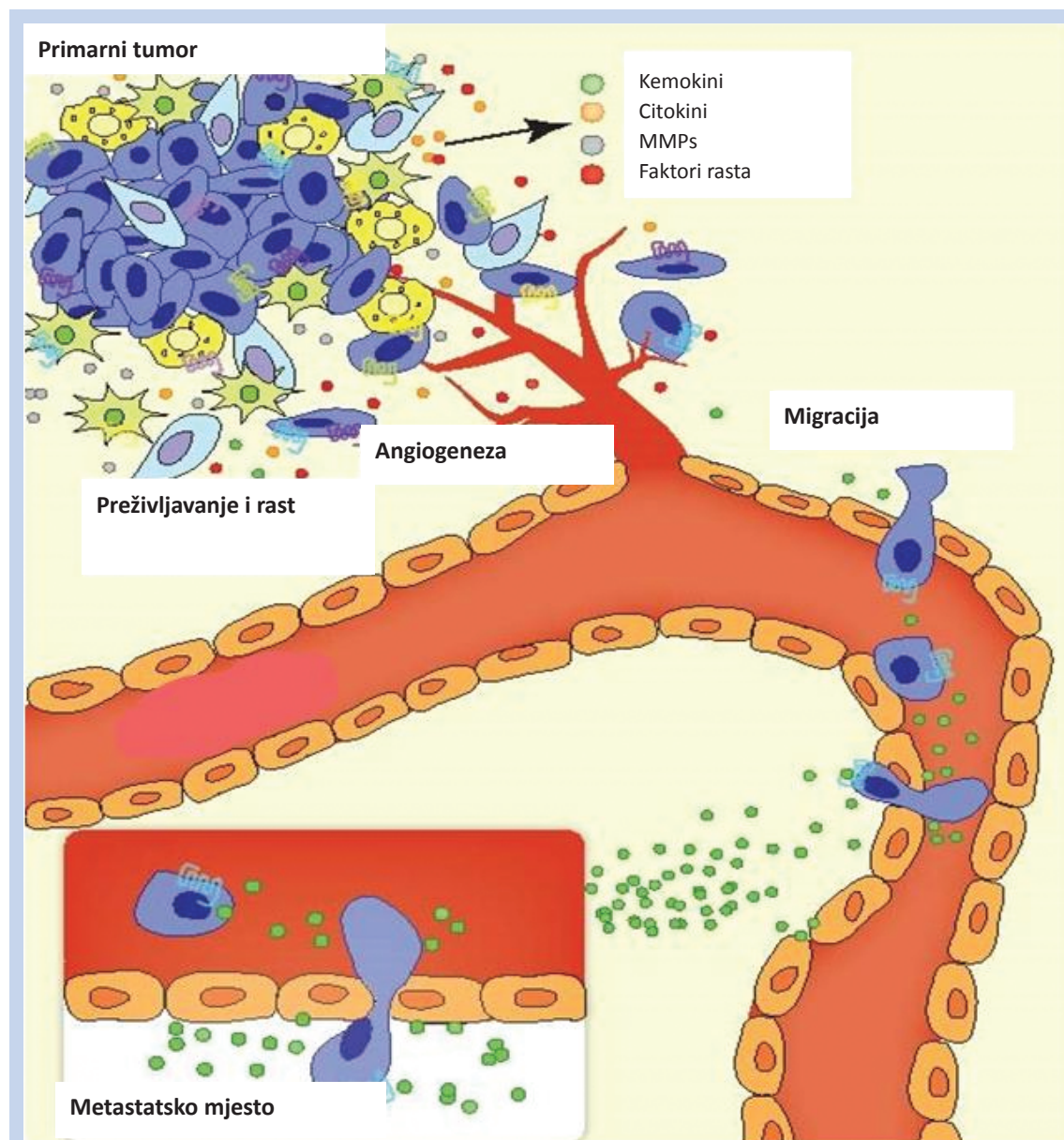
Posljednjih je godina učinjen veliki iskorak u razumijevanju molekularnih mehanizama koji prethode nastanku raka dojke. Primjerice, nedvojbeno je pokazano kako ljudski hormon rasta (hGH) igra

važnu ulogu u progresiji raka dojke, odnosno, kako upravo ovaj hormon može biti jedan od glavnih pokretača procesa metastaziranja. Nedavno su istraživanja na staničnoj liniji raka dojke MCF-7 dala doprinos ovoj tezi jer je upravo autokrina proizvodnja hGH u stanicama bila pokretač njihove migracije, putem procesa preoblikovanja E-kadherina, u okolni matriks<sup>4</sup>. Nedavno je također pokazano kako je autokrina regulacija hGH u raku dojke povezana s aktivacijom i lokalizacijom proteina Pax-5 u jezgri, što je dovoljno za indukciju proliferacije tumorskih stanica<sup>5</sup>. Lobie i suradnici u više su radova<sup>4,6</sup> opisali niz gena, uključujući gene HOXA1 i CHOP, koji sudjeluju u onkogenim transformacijama stanica pod utjecajem hGH, stoga smo u nedavnom istraživanju (rezultati u postupku objavljivanja) u našem laboratoriju pratili ekspresiju hGH i GH-R u invazivnom duktalnom karcinomu i benignom fibroadenomu. Reakcija je određena imunohistokemijski na mjestu najjače reakcije (tzv. "hot spot") pod velikim povećanjem (400X), na 1.000 tumorskih stanica. "Hot spot" je određen pod malim povećanjem (40X) pregledavanjem čitavog odabranog prereza. Tijekom istraživanja određivali su se parametri veličine tumora, gradus, estrogenski i progesteronski receptori, HER-2 te TNM klasifikacija, pri čemu nije utvrđena korelacija između imunohistokemijske izraženosti reakcije na GH i GH-R karcinoma s navedenim parametrima. Rezultati imunohistokemijske analize pokazali su kako prisutnost GH-R u invazivnom obliku tumora iznosi 75%, dok je ona zabilježena u samo 2% fibroadenoma. Uz to, prisutnost hGH u fibroadenomu bila je 96.7%, u usporedbi s 20% kod invazivnog tumora, stoga je jasno kako je hGH izuzetno važan čimbenik u progresiji tumora, a ostvaruje se putem pojačane ekspresije GH-R.

Još jedan faktor rasta za koji se smatra kako pozitivno utječe na proliferaciju i pokretljivost stanica je inzulinski faktor rasta IGF-1. Učinkovita terapija raka dojke trebala bi prije svega omogućiti smanjenje ekspresije IGF-1 u serumu za barem 20%. Nažalost, niti jedna postojeća terapija ne može zadovoljavajuće smanjiti njegovu koncentraciju<sup>7</sup>. Osim elemenata autokrine regulacije tumora dojke, u čitavom je nizu proteomskih istraživanja otkriven veliki broj proteina koji su ključni za razu-

mijevanje molekularnih mehanizama nastanka raka dojke. Ti proteini, naime, sudjeluju u rastu stanice, onkogenoj progresiji i procesima stanične smrti. Primjerice, uz pomoć proteinskih čipova koji na svojoj površini sadrže imobilizirana protutijela, detaljno je analizirana aktivacija receptora ERBB koji je izuzetno važan čimbenik malignog fenotipa raka dojke<sup>8</sup>. Uz pomoć metoda proteomike detaljno je istražena i objašnjena uloga i način djelovanja istog receptora kao i proteina ovog si-

gnalnog puta koji su povezani s napretkom bolesti, metastaziranjem i lošom kliničkom prognozom<sup>9</sup>. Nadalje, istražen je proteomski profil zdravog i malignog uzorka tkiva dojke, gdje je pronađen određeni broj proteina s povećanom ekspresijom u malignom tkivu. Neki od tih proteina bili su kazein kinaze, p53, aneksin XI, CDC25C, eIF-4E i MAP kinaza 7, dok je s druge strane u malignom tkivu ekspresija multifunkcionalnog regulatora 14-3-3e bila smanjena<sup>3</sup>.



**Slika 2.** Histološki prikaz raka dojke: a) narančastom bojom obojano je normalno tkivo; plavičasto-ljubičasto oboljenje karakteristično za stanice raka; b) invazija stanica raka u okolno normalno tkivo, povećano 200X (zahvaljujući dr. Cecil Fox).

**Figure 2.** Histological description of breast cancer: a) normal tissue is orange coloured. Cancer cells are blue-purple coloured, b) infiltration of cancer cells into surrounding normal tissue, magnification 200X (thanks to dr.Cecil Fox).

Jedna od rutinskih metoda za razdvajanja proteina iz smjese je dvodimenzionalna gel-elektroforeza 2-DE, nakon koje se diferencijalno ekspimirani proteini identificiraju uz pomoć metode masene spektrometrije (MS) MALDI-TOF (engl. *matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight*). Zahvaljujući ovakvom pristupu analize proteina, u tumorskim tkiva raka dojke identificirani su brojni mogući novi biomarkeri. Ti su proteini povezani s nastankom ili progresijom bolesti, a zovu se galektin-1, aneksin-5 i aneksin-1, LDH-B,

Borba protiv raka dojke moguća je jedino uz potpuno razumijevanje molekularne kompleksnosti koja je uzrok njegova nastanka. Nove, globalne metode analize gena i proteina vode u razdoblje personalizirane molekularne medicine, gdje će novi lijekovi i terapija biti krojeni po mjeri bolesnika u ovisnosti o tome kakav je ekspresijski profil tumora utvrđen analizom tumorskog tkiva bolesnika.

GST-pi, aktin, vimentin, HSP70, CK18 i moezin<sup>10-12</sup>. Slično je, osim već dobro opisanih proteina stresa koji su uključeni u glikolizu, antioksidativni stres i detoksifikacijske putove, nedavno utvrđena posebna uloga citokeratina 19 u staničnim događajima koji rezultiraju jakim malignom proliferacijom stanica raka dojke<sup>13</sup>. Otkriven je i čitav niz proteina koju su povezani s metastaziranjem tumora, kao, primjerice, osteopontin i osteonektin, dok su metaloproteinaza matriksa 1 i aneksin 1 povezani s fenotipom stanica koje ne metastaziraju<sup>14</sup>.

Vrlo zanimljivo istraživanje povedeno je na četiri tumorske stanične linije kojima je zajednička genetska pozadina. Te su stanične linije rastom u kulturi postepeno zadobile metastatski potencijal. Uz pomoć metode iTRAQ ESI-LC/MS/MS (engl. *isobaric tag for relative and absolute quantitation electrospray ionization-liquid chromatography*) identificirane su one promjene za koje se vjeruje da uzrokuju direktnu promjenu fenotipa, a radilo se o proteinima iz obitelji kinaza, fosfataza te nekim transkripcijskim faktorima. Kako su stanice postajale sve invazivnije, analiza je pokazivala sniženu ekspresiju proteina SH3GLB1 i povećanu ekspresiju proteina SUB1, SND1 i TRIM28<sup>15</sup>. Slično je, uz pomoć tehnologije multi-

dimenzionalne identifikacije proteina, utvrđena aktivnost za preko pedeset proteina, od čega gotovo jedna trećina do sada uopće nije bila povezana s rakom dojke<sup>16</sup>. Njihova se točna uloga, međutim, mora dodatno istražiti.

Još jedna moćna metoda za analizu proteina je pristup SELDI-TOF (engl. *Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight*). Ovom metodom uspoređeno je tumorsko i zdravo tkivo što je rezultiralo identifikacijom trideset i osam proteina s povećanom ekspresijom i petnaest proteina sa sniženom ekspresijom. Povećanu ekspresiju imali su proteini Wdr1, koronin-1A i p34-Arc, što se može povezati s procesom preoblikovanja aktina tijekom nastanka raka dojke<sup>17</sup>.

#### ZAKLJUČAK

Danas je znanstvenicima jasno kako patogenezu složene i heterogene bolesti raka dojke nije moguće u potpunosti razjasniti uz pomoć metoda tradicionalne medicine, kao ni uz pomoć klasičnih metodoloških pristupa koji su se koristili u molekularnoj medicini posljednjih desetljeća. Izuzetno je važno, naime, u borbi protiv raka dojke upoznati molekularnu kompleksnost koja je uzrok njegova nastanka. Bazično razumijevanje bolesti može potom omogućiti i razvoj novih terapijskih pristupa, stoga je neobično važno žurno otkrivanje novih biljega koji bi pomogli u ranoj detekciji bolesti te služili za razvoj ciljane terapije koja bi specifično djelovala samo na tumorske stanice. Globalne metode proteomike i genomike omogućuju istovremeno praćenje profila ekspresije stotina proteina ili gena, pri čemu je moguće otkriti nove signalne putove uključene u patogenezu bolesti koji se do sada nisu mogli detektirati. Proteomske analize važne su osobito stoga što upotpunjuju rezultate dobivene analizom ekspresijskog profila gena. Naime, jedino razumijevanje promjena na razini ekspresije gena i proteina može dovesti do novih spoznaja o složenosti mehanizma nastanka tumora. Dosadašnji rezultati iz područja istraživanja raka dojke u kombinaciji s globalnim metodama istraživanja statusa ekspresije gena i proteina pokazali su kako je u patogenezu raka dojke uključen i ljudski hormon rasta (hGH) te mehanizmi autokrine regulacije preko proteina Pax-5. Također je utvrđena važnost aktivacije re-

ceptora ERBB, a identificiran je čitav niz proteina koji su diferencijalno eksprimirani u tumorskom tkivu, kao što su to, primjerice, HOXA1, CHOP SH3GLB1, kazein kinaze Ie, p53, aneksin XI, CD-C25C, eIF-4E i MAP kinaza 7 multifunkcionalan regulator 14-3-3e galektin-1, aneksin-5 i 1, LDH-B, GST-pi, aktin, vimentin, HSP70, CK18, moezin, SH3GLB1, SUB1, SND1 i TRIM28. Uspješno je pronađena i poveznica između remodelacije aktina s nastankom raka dojke preko gena Wdr1, koronina-1A i p34-Arc. Pronađeni su i markeri osteopontin i osteonektin koji su povezani s procesom metastaziranja tumora te markeri metaloproteinaza-1 i aneksin-1 koji su povezani s nemetastatskim fenotipom stanica raka dojke. Svi ovi novotkriveni proteini predstavljaju potencijalne mete za nove lijekove, a neki će od njih biti korišteni kao predikcijski markeri i markeri za klasifikaciju tumora.

Zaključno, glavni cilj svih proteomskih i genomskih istraživanja odgonetnuti je molekularne promjene koje vode u onkogenu transformaciju stanica. Zahvaljujući novim globalnim pristupima moguće je u jednoj analizi dobiti veliki broj informacija o ekspresijskim profilima proteina i gena koji su uključeni u nastanak i napredak tumora. Također je moguće identificirati i pronaći nove ključne proteine za koje se nije znalo imaju li ulogu u razvoju ove bolesti. U razumijevanju i shvaćanju uzroka nastanka tumora, kao i čitave mreže signalnih putova receptora, leži i odgovor kako najučinkovitije liječiti ili čak potpuno prevenirati ovu opaku bolesti. Znanja i mogućnosti koje donose nove metode vode u razdoblje personalizirane molekularne medicine, gdje će novi lijekovi i terapija biti krojeni po mjeri bolesnika u ovisnosti o tome kakav je ekspresijski profil tumora utvrđen analizom tumorskog tkiva bolesnika.

## ZAHVALA

Ovaj rad nastao je uz financijsku potporu projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa 098-0982464-2393, projekta Fonda za zapošljavanje i razvoj RH 14V09809 te projekta HAZU "Molekularno profiliranje metastazirajućeg tumora dojke".

## LITERATURA

1. Nimeus E, Malmstrom J, Johnsson A, Marko-Varga G, Ferno M. Proteomic analysis identifies candidate proteins associated with distant recurrences in breast cancer after adjuvant chemotherapy. *J Pharm Biomed Anal* 2006;43:1089-93.
2. Dressman HK, Hans C, Bild A, Olson JA, Rosen E, Marcom PK et al. Gene expression profiles of multiple breast cancer phenotypes and response to neoadjuvant chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2006;12:819-26.
3. Hudelist G, Singer CF, Kubista E, Czerwenka K. Use of high-throughput arrays for profiling differentially expressed proteins in normal and malignant tissues. *Anticancer Drugs* 2005;16:683-9.
4. Mukhina S, Mertani HC, Guo K, Lee KO, Gluckman PD, Lobie PE. Phenotypic conversion of human mammary carcinoma cells by autocrine human growth hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:15166-71.
5. Vouyovitch CM, Vidal L, Borges S, Raccurt M, Arnould C, Chiesa J et al. Proteomic analysis of autocrine/paracrine effects of human growth hormone in human mammary carcinoma cells. *Adv Exp Med Biol* 2008;617:493-500.
6. Perry JK, Starling Emerald B, Mertani H, Lobie PE. The oncogenic potential of growth hormone. *Growth Horm IGF Res* 2006;16:277-89.
7. Waters MJ, Barclay JL. Does growth hormone drive breast and other cancers. *Endocrinology* 2007;148:4533-5.
8. Nielsen UB, Cardone MH, Sinskey AJ, MacBeath G, Sorger PK. Profiling receptor tyrosine kinase activation by using Ab microarrays. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:9330-5.
9. Zhang D, Tai LK, Wong LL, Chiu LL, Sethi SK, Koay ES. Proteomic study reveals that proteins involved in metabolic and detoxification pathways are highly expressed in HER-2/neu-positive breast cancer. *Mol Cell Proteomics* 2005;4:1686-96.
10. Sun B, Zhang S, Zhang D, Li Y, Zhao X, Luo Y et al. Identification of metastasis-related proteins and their clinical relevance to triple-negative human breast cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:7050-9.
11. Kreunin P, Yoo C, Urquidi V, Lubman DM, Goodison S. Proteomic profiling identifies breast tumor metastasis-associated factors in an isogeni model. *Proteomics*. 2007; 7:299-312.
12. Hathout Y, Gehrmann ML, Chertov A, Fenselau C. Proteomic phenotyping: metastatic and invasive breast cancer. *Cancer Lett*. 2004; 210:245-53.
13. Zhang DH, Tai LK, Wong LL, Sethi SK, Koay ES. Proteomics of breast cancer: enhanced expression of cytokeratin19 in human epidermal growth factor receptor type 2 positive breast tumors. *Proteomics* 2005;5:1797-805.
14. Kreunin P, Urquidi V, Lubman DM, Goodison S. Identification of metastasis-associated proteins in a human tumor metastasis model using the mass-mapping technique. *Proteomics* 2004;4:2754-65.
15. Ho J, Kong JW, Choong LY, Loh MC, Toy W, Chong PK et al. Novel breast cancer metastasis-associated proteins. *J Proteome Res* 2009;8:583-94.
16. Jessani N, Niessen S, Wei BQ, Nicolau M, Humphrey M, Ji Y et al. A streamlined platform for high-content functional proteomics of primary human specimens. *Nat. Methods* 2005;2:691-7.
17. Kim DH, Bae J, Lee JW, Kim SY, Kim YH, Bae JY et al. Proteomic analysis of breast cancer tissue reveals upregulation of actin-remodeling proteins and its relevance to cancer invasiveness. *Proteomics Clin* 2009;3:30-40.