

Межклеточные взаимодействия и развитие гормональной резистентности клеток рака молочной железы

С.Е. Семина¹, Д.В. Багров², М.А. Красильников¹

¹НИИ канцерогенеза ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»; Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГБОУ ВПО МГУ им. М.В. Ломоносова; Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, 1

Контакты: Светлана Евгеньевна Семина s.e.semina@gmail.com

Основная задача работы — исследование роли межклеточных взаимодействий в развитии гормональной резистентности злокачественных опухолей, в частности опухолей молочной железы. Около 70 % опухолей молочной железы сохраняют рецепторы эстрогенов (ER) — основную мишень при действии гормональных препаратов на опухолевые клетки, однако эффективность гормонотерапии во многом ограничена развитием резистентности, приводящей к формированию эстрогеннезависимого фенотипа клеток. Различают врожденную и приобретенную гормональную резистентность рака молочной железы (PMЖ) (под последней подразумевают резистентность к гормональным препаратам, развившуюся в процессе терапии). В обоих случаях снижение гормональной зависимости может быть обусловлено как уменьшением содержания ER, так и рядом других факторов, среди которых нарушение баланса между белками-активаторами и супрессорами ER, лиганднезависимая активация ER, а также стимуляция сигнальных путей, идущих в обход ER и поддерживающих тем самым рост опухоли в отсутствие эстрогенов. Вместе с тем практически не исследована роль межклеточных взаимодействий в развитии гормональной резистентности опухолевых клеток. В отдельных работах отмечается участие межклеточных взаимодействий в реализации гормонального ответа опухолевых клеток, однако значение этого механизма для развития гормональной резистентности остается неясным.

Мы предположили, что межклеточные взаимодействия могут влиять на формирование резистентного фенотипа клеток, в частности совместный рост гормоночувствительных и резистентных клеток может стимулировать распространение гормональной резистентности и на чувствительные клетки за счет продукции специфических факторов и их воздействия на соседние клетки либо паракринным путем, либо через собственно межклеточные контакты. На моделях клеток эстрогензависимого PMЖ MCF-7 и резистентной субпопуляции MCF-7/T, полученной путем длительного культивирования клеток MCF-7 с антиэстрогеном тамоксифеном, исследована возможность изменения гормональной чувствительности этих клеток при кокультивировании *in vitro*. Предварительно гормонорезистентные клетки MCF-7/T были трансфицированы плазмидой, содержащей зеленый флуоресцентный белок (green fluorescent protein, GFP), что позволило в дальнейшем отличить их от родительских клеток MCF-7. Мы показали, что кокультивирование этих двух линий в течение 10 сут достаточно для развития частичной резистентности к тамоксифену у родительских клеток MCF-7. Примечательно, что уровень гормональной чувствительности резистентных клеток MCF-7/T/GFP+ в этих условиях оставался по-прежнему низким. Далее было продемонстрировано, что к аналогичному развитию гормональной резистентности приводит добавление к родительским клеткам MCF-7 препаратов экзосом, полученных от резистентных клеток MCF-7/T/GFP+ (но не от родительских клеток), что свидетельствует о непосредственном участии экзосом в формировании гормональной резистентности. Клонирование полученных подобным образом резистентных клеток показало, что вновь приобретенный резистентный фенотип сохраняется на протяжении не менее 80 сут культивирования, иными словами является практически необратимым.

В целом мы рассматриваем полученные результаты как свидетельство возможного участия межклеточных взаимодействий в реализации гормонального ответа и развитии гормональной резистентности, что открывает новые подходы в поиске мишеней для таргетной терапии опухолей молочной железы.

Ключевые слова: рак молочной железы, гормональная резистентность, тамоксифен, экзосомы, микроРНК, рецептор эстрогена, межклеточные взаимодействия

DOI: 10.17650/2313-805X.2015.2.2.50–62

Intercellular interactions and progression of hormonal resistance of breast cancer cells

S.E. Semina¹, D.V. Bagrov², M.A. Krasil'nikov¹

¹Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center; 24 Kashirskoye Highway, Moscow, 115478, Russia;

²M.V. Lomonosov Moscow State University; 1 Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russia

The main goal of the study is the analysis of the role of cell-cell interactions in the formation of the tumor cell resistance to hormonal drugs. About 70 % of breast tumors contain estrogen receptor (ER), a key molecular target for hormone (endocrine) therapy. However, the efficiency of endocrine therapy of breast cancer is limited by the development of hormone resistance which leads to progression of tumor cells to hormone-independent phenotype, increase in tumor malignancy and worse prognosis. Hormonal independence may be accompanied with the loss of the receptors, as well as with the another mechanisms including ligand-independent receptor activation, disbalance between receptor activators and repressors, stimulation of hormone-independent pathways. It is less known about the role of the intercellular interactions in the progression of hor-

monal resistance. Several studies demonstrate the involvement of cell junctions in the mediating of cell response to (anti) estrogens, however the significance of cell-cell contacts in the formation of hormonal resistance still not clear.

Here we have hypothesized that the formation of the hormone resistance of tumors may be based, at least in part, on the transferring of the resistant phenotype from the resistant to hormone-sensitive cells — as a result of the secretion of the specific factors acting in the paracrine manner or via the direct cell-cell contacts. Using the estrogen-dependent breast cancer cells MCF-7 and the resistant subline MCF-7/T developed by long-term cultivation of MCF-7 cells in the presence of antiestrogen tamoxifen, we investigated the possible changes in the hormonal sensitivity of these cells caused by the co-cultivation *in vitro*. To discern the cell cultures, the MCF-7/T cells were previously transfected with the plasmid containing the gene of the green fluorescent protein (GFP), and GFP-positive hormone-resistant subline MCF-7/T/GFP+ was developed. We showed that the co-cultivation of the parent and resistant cells lead to increase in the resistance of the parent cell to tamoxifen. To further explore the mechanism of such resistance, the analysis of the biological activity of exosomes prepared from the estrogen-sensitive and resistant cells was performed. The exosome preparations isolated from the resistant MCF-7/T cells were found to induce the similar resistance in the recipient MCF-7 cells — in contrast to the control exosomes isolated from the MCF-7 cells. The subsequent cloning of these newly formed resistant cells showed that the cells retain the resistant phenotype for at least 80 days of cultivation.

Totally, the results presented demonstrate the important role of cell-cell interactions in the progression of hormonal resistance, opening a new perspectives in the development of probable targets for breast cancer therapy.

Key words: breast cancer, hormonal resistance, tamoxifen, exosomes, microRNA, estrogen receptor, intercellular interactions

Введение

Проблеме гормональной резистентности злокачественных новообразований посвящено достаточно много работ, установлены основные пути развития резистентности, подробно исследованы модели резистентности *in vitro*. Основу современных представлений о механизме действия стероидных гормонов заложила теория E.V. Jensen [1], предложившего двухступенчатую модель действия гормона. В рамках этой модели молекула стероидного гормона, проникая внутрь клетки-мишени, связывается со специфическим белком-рецептором, затем образовавшийся гормонорецепторный комплекс транслоцируется в клеточное ядро, где взаимодействует со специфическими последовательностями ДНК и изменяет экспрессию соответствующих генов. За последующие 40 лет были существенно расширены представления о механизме действия стероидов, расшифрованы доменная структура рецепторов и последовательность рецепторсвязывающих участков ДНК, открыты и описаны эпигеномные эффекты рецепторов, но в целом основные положения модели E.V. Jensen остаются справедливыми и сегодня.

Присутствие специфических рецепторов совершенно необходимо для реализации действия гормонов и во многом определяет уровень гормональной зависимости опухолей. Так, содержание рецепторов эстрогенов (ER) является на сегодняшний день основным критерием определения чувствительности больных раком молочной железы (РМЖ) к антиэстрогенам (в частности, к тамоксифену) и другим видам гормонотерапии [2–7]. Различают врожденную и приобретенную гормональную резистентность РМЖ (под последней подразумевают резистентность к гормональным препаратам, развившуюся в процессе терапии). В обоих случаях снижение гормональной зависимости может быть обусловлено как уменьшением содержания ER, так и рядом других факторов, среди которых нарушение баланса между белками-актива-

торами и супрессорами ER, лиганднезависимая активация ER, а также стимуляция сигнальных путей, идущих в обход ER (EGFR, PI3K, NF-κB) и поддерживающих тем самым рост РМЖ в отсутствие эстрогенов [8–12].

Вместе с тем практически не исследована роль межклеточных взаимодействий в развитии гормональной резистентности опухолевых клеток. Влияние межклеточных взаимодействий на метаболизм клеток может реализовываться в нескольких направлениях. Во-первых, это образование собственно контактов между клетками, в частности щелевых, через которые может осуществляться обмен функционально активных факторов [13–15]. Во-вторых, путем паракринной регуляции, в том числе через продукцию в окружающую среду ростовых факторов, способных инициировать сигнальные каскады, отвечающие за рост и пролиферацию клеток [16–18]. И в-третьих, через продукцию клетками экзосом — мельчайших везикул, содержащих как метаболически активные белки, так и некоторые нуклеиновые кислоты, в том числе микроРНК [19–22]. Продемонстрировано значение межклеточных взаимодействий в сенсibilизации опухолевых клеток к цитостатическим препаратам, в частности отмечается участие экзосом в развитии и распространении множественной лекарственной устойчивости [23, 24], изменении клеточной подвижности и миграции [25], однако этот механизм практически не исследовался при развитии гормональной резистентности.

В настоящей работе изучалась роль межклеточных взаимодействий в развитии гормональной резистентности клеток РМЖ, в частности возможность «горизонтального» пути регуляции уровня гормонального ответа от клетки к клетке. Мы показали, что кокультивирование гормоночувствительных и резистентных клеток РМЖ приводит к снижению гормональной зависимости чувствительных клеток. Решающим фактором в подобном «горизонтальном»

пути передачи гормональной резистентности являются межклеточные взаимодействия, реализуемые в том числе с участием экзосом, продуцируемых резистентными клетками.

Материалы и методы

Культивирование клеток. Клетки РМЖ человека линии MCF-7 культивировали в стандартной среде DMEM, содержащей 7 % эмбриональную сыворотку телят (FBS NuClone, США) и гентамицин (50 ед/мл) («ПанЭко», Россия), при 37 °С и 5 % CO₂. При анализе скорости роста и чувствительности к тамоксифену количество клеток определяли либо при подсчете в камере Горяева, либо с использованием МТТ-теста, основанного на утилизации живыми клетками реагента МТТ (3-[4,5-диметилтиазол-2]-2,5-дифенилтетразол бромид).

Трансфекция клеток. Трансфекцию клеток плазмидой pEGFP-N1 (предоставлена Д.Е. Андреевым, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Москва) проводили в течение 4 ч с использованием реагента Metafectene PRO (Biontix Laboratories GmbH, Германия) при 37 °С. Селекцию клеток выполняли в присутствии G-418 в течение 14 сут. Эффективность трансфекции и последующей селекции оценивали при определении количества флуоресцирующих GFP-позитивных клеток с помощью флуоресцентного микроскопа AxioPlan 2 ZEISS (Carl Zeiss, Германия).

Выделение и характеристика препаратов экзосом.

Экзосомы выделяли из кондиционированной культуральной среды по стандартной методике, как описано J.S. Bonifacino et al. [26]. Коротко, клетки культивировали в течение 4 сут в стандартной среде, затем культуральную жидкость в равных объемах с каждой линии собирали и последовательно центрифугировали 30 мин при 300g и 2000g и 2 ч при 10 000g. После каждого центрифугирования супернатант переносился в новые пробирки, полученные осадки растворяли в 500 мкл PBS. Все работы выполнялись стерильно. Для проведения иммуноблоттинга препараты экзосом лизировали в буфере следующего состава: 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 % Igepal CA-630; 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 мкг/мл aprotinin, leupeptin и pepstatin, 1 mM NaF и 1 mM ортованадат Na. Образцы центрифугировали (10 000g, 10 мин, 4 °С) и проводили стандартный электрофорез и иммуноблоттинг, как описано ранее [27], с использованием антител к CD81 (BioLegend, США) и β-актину (Cell Signaling, США).

Электронная микроскопия экзосом. Для исследования методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) образцы экзосом готовили следующим образом. Медные сетки, покрытые углеродом (TedPella), обрабатывали в тлеющем разряде с помощью установки Emitech K100X. Затем на них в течение 3–5 мин адсорбировали экзосомы, суспендированные в PBS, и препараты контрастировали 1 % раствором

уриилацетата. Измерения проводили на ПЭМ Jeol-1011 при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Статистическая обработка. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 10.0. Во всех случаях статистические критерии считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Разработка экспериментальной модели приобретенной гормональной резистентности клеток РМЖ. Клетки аденокарциномы молочной железы человека линии MCF-7 культивировали в стандартной среде DMEM, содержащей 7 % эмбриональную сыворотку телят (NuClone, США) и гентамицин (50 ед/мл) («ПанЭко», Россия), при 37 °С и 5 % CO₂. Субпопуляция MCF-7/T получена путем длительной (60 сут) селекции клеток MCF-7 в присутствии антиэстрогена тамоксифена. После окончания селекции полученную сублинию культивировали в стандартных условиях в течение не более 6 мес.

Уровень гормональной зависимости сублинии MCF-7/T определяли по изменению скорости пролиферации после добавления к клеткам антиэстрогена тамоксифена. Скорость пролиферации находили с помощью МТТ-теста. Результаты теста показали, что полученная сублиния MCF-7/T характеризуется относительной резистентностью к антипролиферативному действию тамоксифена по сравнению с клетками родительской линии (рис. 1а).

Получение стабильного GFP-позитивного клона гормоннезависимой сублинии MCF-7/T. Целью следующего этапа экспериментов было изучение возможности «горизонтального» пути регуляции уровня гормонального ответа, в том числе развития гормональной резистентности при совместном культивировании резистентных и гормонозависимых клеток. Для решения этой задачи была получена стабильная GFP-продуцирующая гормонорезистентная сублиния, в которой присутствие гена зеленого флуоресцентного белка (green fluorescent protein, GFP) позволяло отличить эти клетки от гормоночувствительных при их совместном культивировании. Коротко, гормонорезистентные клетки MCF-7/T были трансфицированы плазмидой pEGFP-N1, содержащей GFP, с последующей селекцией GFP-позитивных клонов. В результате селекции выделен стабильный клон MCF-7/T с содержанием GFP-позитивных клеток ≥ 98 %, достаточным для проведения дальнейших экспериментов (рис. 1б).

Влияние совместного культивирования гормоночувствительных и резистентных клеток на уровень гормонального ответа. В экспериментах по совместному культивированию родительских клеток MCF-7 (GFP-негативных) с резистентными (GFP-позитивными) клетками MCF-7/T/GFP+ и последующему определению чувствительности обеих линий к тамоксифену мы обнаружили, что кокультивирование этих двух линий в течение 10 сут приводит к развитию частич-

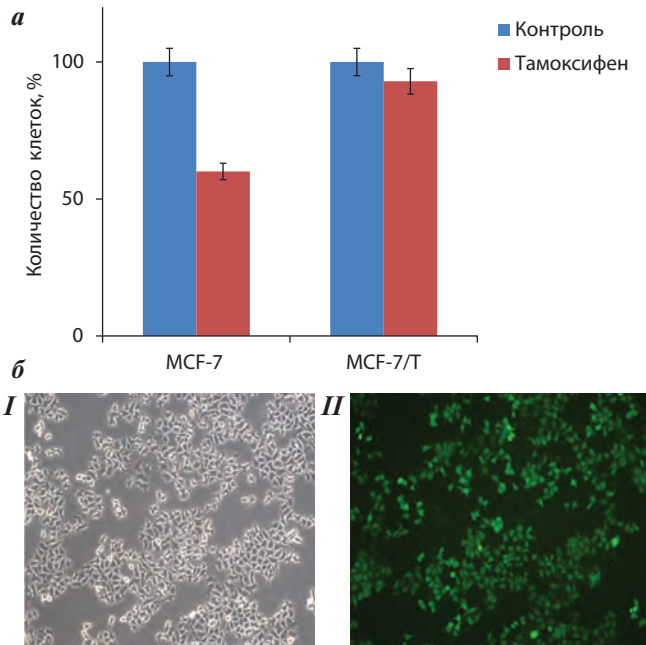


Рис. 1. Получение сублинии клеток MCF-7/T:

а — клетки линии MCF-7 культивировали в течение 30 сут с последовательным повышением концентрации тамоксифена от 10^{-8} М до 10^{-5} М. Затем клетки переводили в стандартную среду без тамоксифена на срок не менее 10 сут. Чувствительность к тамоксифену определяли с помощью МТТ-теста после однократного добавления тамоксифена в концентрации 5×10^{-6} М;

б — клетки MCF-7/T были трансфицированы плазмидой pEGFP-N1, содержащей GFP. Далее проводили селекцию и клонирование для получения популяции клеток, стабильно экспрессирующих GFP. Процент GFP-позитивных клеток в популяции составляет $\geq 98\%$. **I** — общий вид клеток MCF-7/T при световой микроскопии, **II** — флуоресценция GFP-позитивных клеток MCF-7/T/GFP+

ной резистентности к тамоксифену у родительских клеток MCF-7 (рис. 2а). Примечательно, что уровень гормональной чувствительности резистентных клеток MCF-7/T/GFP+ в этих условиях не изменяется (рис. 2б).

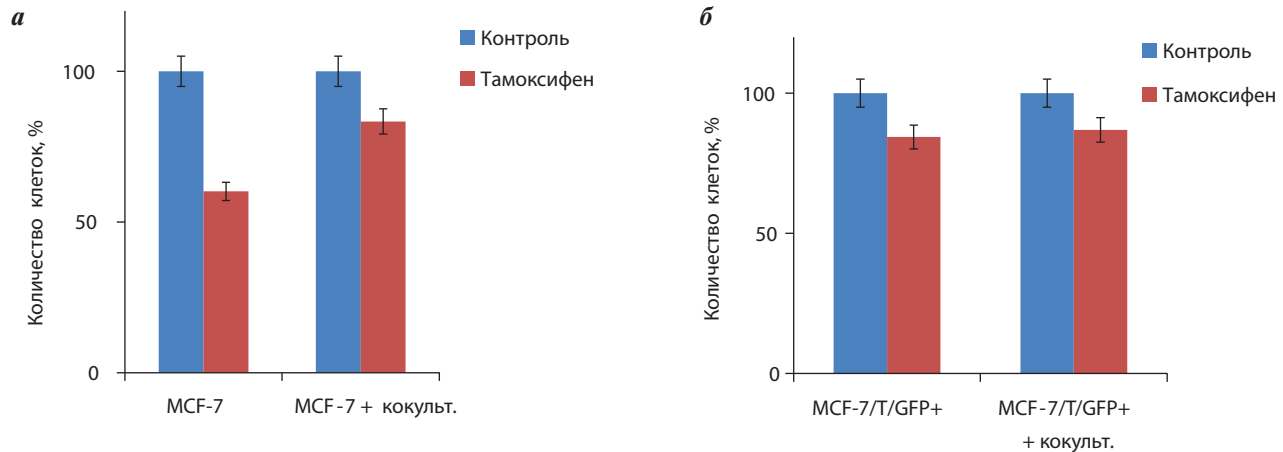


Рис. 2. Влияние совместного культивирования на чувствительность к тамоксифену клеток MCF-7 и MCF-7/T/GFP+. Клетки MCF-7 и MCF-7/T/GFP+ кокультивировали в течение не менее 14 сут в стандартной среде. Затем добавляли тамоксифен в концентрации 5×10^{-6} М на 3 сут и определяли количество нефлуоресцирующих и флуоресцирующих клеток в камере Горяева:

а — влияние тамоксифена на клетки MCF-7 до и после кокультивирования с резистентными клетками MCF-7/T/GFP+;

б — влияние тамоксифена на клетки MCF-7/T/GFP+ до и после кокультивирования с клетками MCF-7/T

Далее из GFP-негативных клеток MCF-7, прошедших кокультивирование с резистентными клетками MCF-7/T/GFP+, были клонированы отдельные клетки и проанализирована чувствительность полученного клеточного клона к тамоксифену. Оказалось, что такая культура (MCF-7/clone R) действительно характеризуется относительной резистентностью к тамоксифену по сравнению с родительскими клетками MCF-7 (рис. 3а). Нам не удалось обнаружить реверсии резистентного фенотипа, во всяком случае на протяжении 80 сут последующего культивирования клеток в стандартных условиях, что свидетельствует о развитии долговременных изменений метаболизма в таких клетках (рис. 3б).

Роль экзосом в развитии гормональной резистентности клеток РМЖ. Для дальнейшего исследования механизма подобной гормональной резистентности, передаваемой от клетки к клетке, из гормоночувствительных и резистентных клеток были получены препараты экзосом и проанализировано их влияние на уровень гормональной зависимости клеток. Предварительно присутствие экзосом в полученных препаратах было верифицировано с помощью иммуноблоттинга с антителами к специфическому маркеру экзосом — CD81 (рис. 4а) и методом просвечивающей электронной микроскопии (рис. 4б). Оказалось, что регулярное добавление (в течение 10 сут) к клеткам MCF-7 экзосом, полученных от резистентных клеток MCF-7/T, приводит к развитию частичной резистентности клеток MCF-7 к тамоксифену. В то же время экзосомы, полученные от родительских клеток MCF-7, не обладают такой активностью и их добавление не приводит к изменению гормональной чувствительности клеток (рис. 4в).

В целом полученные результаты свидетельствуют, что кокультивирование гормоночувствительных и резистентных клеток РМЖ приводит к снижению гормональной зависимости чувствительных клеток. Решающим фактором в подобном «горизонтальном» пути передачи гормональной резистентности являются межклеточные



Рис. 3. Анализ сублинии MCF-7/R, клонированной из клеток MCF-7 после кокультивирования последних с клетками MCF-7/T/GFP+:
 а – клетки MCF-7 после кокультивирования с клетками MCF-7/T/GFP+ клонированы, и чувствительность к тамоксифену полученной сублинии MCF-7/R определялась как описано в методах;
 б – клетки MCF-7/R после клонирования культивировали в стандартной среде в течение 20–80 сут с последующим определением чувствительности к тамоксифену

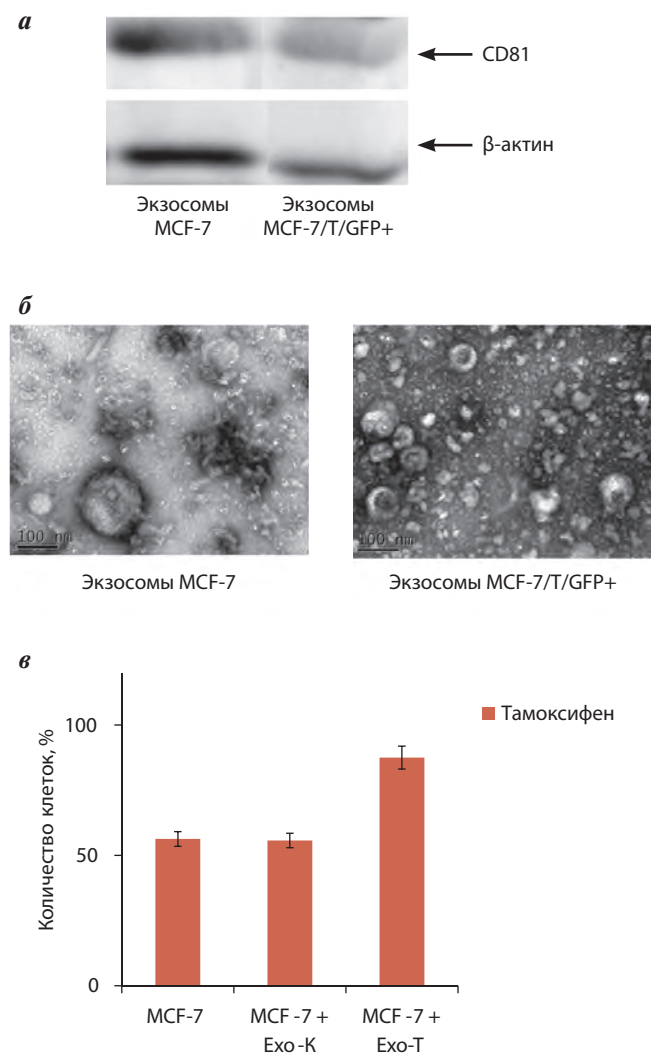


Рис. 4. Экзосомы и чувствительность клеток MCF-7 к тамоксифену:

а – иммуноблоттинг образцов экзосом, полученных от клеток MCF-7 и MCF-7/T/GFP+, с антителами к маркеру экзосом CD81;
 б – ПЭМ препаратов экзосом клеток MCF-7 и MCF-7/T/GFP+;
 в – влияние препаратов экзосом (Echo-K), полученных от клеток MCF-7 и MCF-7/T/GFP+ (Echo-T) на чувствительность клеток MCF-7 к тамоксифену

взаимодействия, реализуемые в том числе с участием экзосом, продуцируемых резистентными клетками.

Заключение

Целью настоящей работы явилось исследование роли межклеточных взаимодействий в развитии гормональной резистентности опухолевых клеток. Появление в опухоли популяции клеток, резистентных к гормонам, и дальнейший совместный рост гормоночувствительных и резистентных клеток по нашим предположениям может стимулировать распространение гормональной резистентности и на чувствительные клетки за счет продукции специфических факторов и их воздействия на соседние клетки либо паракринным путем, либо через собственно межклеточные контакты.

На клетках эстрогензависимого РМЖ (MCF-7) и резистентной субпопуляции (MCF-7/T), полученной путем длительного культивирования клеток MCF-7 с антиэстрогеном тамоксифеном, была продемонстрирована возможность изменения гормональной чувствительности этих клеток при их кокультивировании *in vitro*. Дальнейшее изучение механизма такой резистентности показало, что в переносе резистентного фенотипа на чувствительные клетки участвуют экзосомы, секретируемые резистентными клетками.

В целом мы рассматриваем представленные результаты как впервые полученные свидетельства участия межклеточных взаимодействий в переносе резистентного фенотипа от клетки к клетке и рассчитываем, что дальнейшее продолжение этих исследований позволит установить механизм этого эффекта и его значение в развитии приобретенной гормональной резистентности злокачественных опухолей.

Работа финансировалась из средств гранта Российского научного фонда № 14-15-00362 (эксперименты разделов № 2–4) и Российского фонда фундаментальных исследований № 13-04-00284 (эксперименты раздела № 1) и выполнялась с использованием оборудования Центра коллективного пользования Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова.

ЛИТЕРАТУРА

1. Jensen E.V., DeSombre E.R. Estrogen-receptor interaction. *Science* 1973;182(4108):126–34.
2. Красильников М.А. Современные подходы к изучению механизма эстрогеннезависимого роста опухолей молочной железы. *Вопросы онкологии* 2004; 50(4):399–405. [Krasilnikov M.A. State-of-art approaches to studying of the mechanism of estrogen-independent growth of breast tumors. *Voprosy onkologii = Oncology Issues* 2004;50(4):399–405. (In Russ.)].
3. Clarke R., Liu M.C., Bouker K.B. et al. Antiestrogen resistance in breast cancer and the role of estrogen receptor signaling. *Oncogene* 2003;22(47):7316–39.
4. Lee M., Lee C.S., Tan P.H. Hormone receptor expression in breast cancer: postanalytical issues. *J Clin Pathol* 2013; 66(6):478–84.
5. Normanno N., Di Maio M., De Maio E. et al. Mechanisms of endocrine resistance and novel therapeutic strategies in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2005;12(4):721–47.
6. Jordan V.C. Targeting antihormone resistance in breast cancer: a simple solution. *Ann Oncol* 2003;14(7):969–70.
7. Jalava P., Kuopio T., Huovinen R. et al. Immunohistochemical staining of estrogen and progesterone receptors: aspects for evaluating positivity and defining the cutpoints. *Anticancer Res* 2005;25(3c): 2535–42.
8. Берштейн Л.М. Современная эндокринология гормонозависимых опухолей. *Вопросы онкологии* 2002; 48(4):496–504. [Berstein L.M. Modern endocrinology of hormone-dependent tumors. *Voprosy onkologii = Oncology Issues* 2002;48(4):496–504. (In Russ.)].
9. Красильников М.А. Сигнальные пути, регулируемые фосфатидилинозит-3-киназой, и их значение для роста, выживаемости и злокачественной трансформации клеток. *Биохимия* 2000;65(1):68–78. [Krasilnikov M.A. Signal paths regulated with phosphatidylinosit-3-kinase and their significance for growth, survival, and malignant transformation of cells. *Biokhimiya = Biochemistry* 2000;65(1): 68–78. (In Russ.)].
10. Kurebayashi J. Endocrine-resistant breast cancer: underlying mechanisms and strategies for overcoming resistance. *Breast Cancer* 2003;10(2):112–9.
11. Roop R.P., Ma C.X. Endocrine resistance in breast cancer: molecular pathways and rational development of targeted therapies. *Future Oncol* 2012;8(3):273–92.
12. Красильников М.А., Щербakov А.М. Сигнальные пути, регулируемые эстрогенами, и их роль в опухолевой прогрессии: новые факты и направления поиска. *Успехи молекулярной онкологии* 2014;1:18–26. [Krasilnikov M.A., Shcherbakov A.M. Signal paths regulated with estrogens and their role in tumor progression: new facts and directions of search. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances of Molecular Oncology* 2014;1:18–26. (In Russ.)].
13. Oshima A. Structure and closure of connexin gap junction channels. *FEBS Lett* 2014;588(8):1230–7.
14. El-Saghir J.A., El-Habre E.T., El-Sabban M.E., Talhouk R.S. Connexins: a junctional crossroad to breast cancer. *Int J Dev Biol* 2011;55(7–9):773–80.
15. Rameshwar P. Potential novel targets in breast cancer. *Curr Pharm Biotechnol* 2009;10(2):148–53.
16. Taipale J., Beachy P.A. The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature* 2001;411(6835):349–54.
17. Adjei A.A., Hidalgo M. Intracellular signal transduction pathway proteins as targets for cancer therapy. *J Clin Oncol* 2005;23:5386–403.
18. Niepel M., Hafner M., Pace E.A. et al. Analysis of growth factor signaling in genetically diverse breast cancer lines. *BMC Biol* 2014;12:20.
19. Kohlhapp F.J., Mitra A.K., Lengyel E., Peter M.E. MicroRNAs as mediators and communicators between cancer cells and the tumor microenvironment. *Oncogene* 2015;13.
20. Falcone G., Felsani A., D'Agnano I. Signaling by exosomal microRNAs in cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2015; 34:32.
21. Squadrito M.L., Baer C., Burdet F. et al. Endogenous RNAs modulate microRNA sorting to exosomes and transfer to acceptor cells. *Cell Rep* 2014;8(5): 1432–46.
22. Taylor D.D., Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2008;110(1):13–21.
23. Corcoran C., Rani S., O'Brien K. et al. Docetaxel-resistance in prostate cancer: evaluating associated phenotypic changes and potential for resistance transfer via exosomes. *PLoS One* 2012;7(12).
24. Lv M.M., Zhu X.Y., Chen W.X. et al. Exosomes mediate drug resistance transfer in MCF-7 breast cancer cells and a probable mechanism is delivery of P-glycoprotein. *Tumour Biol* 2014;35(11):10773–9.
25. Harris D.A., Patel S.H., Gucek M. et al. Exosomes released from breast cancer carcinomas stimulate cell movement. *PLoS One* 2015;10(3).
26. Bonifacino J.S., Dasso M., Harford J.B. et al. *Current Protocols in Cell Biology*. John Wiley & Sons, 2004. 3178 p.
27. Scherbakov A.M., Stefanova L.B., Sorokin D.V. et al. Snail/beta-catenin signaling protects breast cancer cells from hypoxia attack. *Exp Cell Res* 2013;319(20):3150–9.