

УДК 577.124

ГАНГЛИОЗИДЫ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ: НОВЫЕ ПЕРСПЕКТИВЫ

Обзор

© 2015 С. Гру-Дегрут, Й. Герардель, С. Жульен,
П. Деланной*

*Structural and Functional Glycobiology Unit, UMR CNRS 8576,
University of Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq, France;
E-mail: philippe.delannoy@univ-lille1.fr*

Поступила в редакцию 16.01.15
После доработки 01.04.15

Ганглиозиды являются неотъемлемыми компонентами плазматической мембраны и участвуют в процессах адгезии, пролиферации и распознавания клеток, а также в модуляции путей передачи сигналов. За эти функции в основном отвечает гликановая составляющая; при патологиях, включая раковые заболевания, в структуре ганглиозидов происходят изменения. Благодаря прогрессу в анализе ганглиозидов методами масс-спектрометрии недавно была выявлена роль ганглиозидов в прогрессировании рака молочной железы. В данном обзоре мы собрали актуальные данные по биосинтезу ганглиозидов и роли дисialogанглиозидов в прогрессировании и образовании метастазов трижды негативного рака молочной железы. Обсуждаются также новые возможности терапии рака молочной железы, использующие в качестве мишеней ганглиозиды.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ганглиозиды, рак молочной железы, масс-спектрометрия, метастаз, синтаза с-Met, G_{D3}.

Ганглиозиды представляют собой подкласс гликофинголипидов (ГСЛ), отличительной чертой которого является присутствие одного или нескольких остатков сиаловых кислот в углеводной части. У млекопитающих они являются неотъемлемыми компонентами внешнего слоя плазматической мембраны, в которой они взаимодействуют с другими сфинголипидами, холестерином и трансмембранными белками, включая рецепторы или переносчики сигналов, образующие липидные рафты. Было показано, что ганглиозиды являются ключевыми молекулами в плазматической мембране, участвующими в процессах адгезии, пролиферации и распознавания клеток, а также в модуляции путей

передачи сигналов [1, 2]. За эти различные функции в основном отвечает гликановая составляющая; в патологических условиях, включая атеросклероз, нейродегенеративные расстройства и рак, в структуре ганглиозидов могут происходить изменения [3–5]. В частности, для ряда опухолей нейроэктодермального происхождения была показана неоэкспрессия дисialogанглиозидов, которые играют ключевую роль в инфильтрации опухолевых клеток и образовании метастазов [6], что делает дисialogанглиозиды привлекательными молекулярными мишенями для иммунотерапии рака [7, 8].

СТРУКТУРА И БИОСИНТЕЗ ГАНГЛИОЗИДОВ

Большая часть структурной изменчивости ганглиозидов связана с углеводным доменом, для которого характерно высокое структурное разнообразие. ГСЛ подразделяют на ряд серий на основании их моносахаридных последовательностей, наиболее распространенными из которых для позвоночных являются (изо)глобо, (нео)лакто, (изо)ганглио, (нео)гала и муко-серии (таблица) [9]. Хотя некоторые ганглиозиды

Принятые сокращения: ГСЛ – гликофинголипиды, ГТ – гликозилтрансфераза, MS – масс-спектрометрия, MALDI – матрикс-ассоциированная лазерная десорбция-ионизация, ДНВ – дигидроксibenзойная кислота, IMS – масс-спектрометрия с визуализацией, ТСХ – тонкослойная хроматография, ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография, т.п.н. – тысячи пар нуклеотидов, а.о. – аминокислотные остатки, ЭР – рецептор эстрогена, миРНК – малые интерферирующие РНК, шРНК – шпилечные РНК, ESI – ионизация электрораспылением, mAb – моноклональные антитела.

* Адресат для корреспонденции.

Основные серии гликофинголипидов у животных

Серия	Структура	Сокращение
Глобо/изоглобо	Gal α 1-4Gal β 1-4/3Glc β 1-Cer	Gb/iGb
Лакто/неолакто	Gal β 1-3/4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer	Lc/nLc
Ганглио/изоганглио	GalNAc β 1-4/3Gal β 1-4Glc β 1-Cer	Gg/iGg
Муко	Gal β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer	Mc
Гала	Gal α 1-4Glc β 1-Cer	Ga

происходят от лакто-, неолакто- и глобо-серий, большинство из них относится к ганглио-серии ГСЛ. Ганглиозиды содержат углеводный кор различной длины, к которому сиаловые остатки могут присоединяться по различным положениям (рис. 1). Основной последовательностью ко-ра является тетрасахарид Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β (Gg₄), но в одном типе клеток, как правило, сосуществуют ди-, три- и тетрасахаридные версии, в то время как общее число замещающих сиаловых остатков кислот варьирует от 0 (что формально не соответствует определению ганглиозида) до 5.

Биосинтез ганглиозидов начинается с переноса остатка глюкозы в *цис*-Гольджи на церамид (Cer) ферментом UDP-Glc: N-ацилсфингозин β -D-глюкозилтрансферазой (GlcCer-синтазой), кодируемой геном *UGCG* [11]. Глюкозилцерамидсинтаза высокоспецифична по отношению к церамиду и может ингибироваться D,L-трео-1-фенил-2-деканоиламино-3-морфолино-1-пропаноном (PDMP) или D,L-трео-1-фенил-2-пальмитоиламино-3-морфолино-1-пропаноном (PPMP), блокируя синтез практически всех ГСЛ [12]. Следующим шагом является галактозилирование глюкозилцерамида (GlcCer) до лактозилцерамида (LacCer) ферментом UDP-Gal: GlcCer β 1,4-галактозилтрансферазой (LacCer-синтазой) [13, 14]. Последующий перенос остатков сиаловых кислот на LacCer катализируется сиалилтрансферазами ST3Gal V (G_{M3}-синтазой), ST8Sia I (G_{D3}-синтазой) и ST8Sia V (G_{T3}-синтазой), каждая из которых обладает высокой специфичностью в отношении гликолипидных субстратов [15]. Было показано, что ST3Gal V человека в качестве субстрата-акцептора для синтеза G_{M3} (II³Neu5Ac₁-Gg₂Cer) [16] использует только LacCer. G_{D3}-синтаза (GD3S) ST8Sia I также высокоспецифична к G_{M3} [17], но фермент человека также может использовать G_{D3}

(II³Neu5Ac₂-Gg₂Cer) для синтеза G_{T3} (II³Neu5Ac₃-Gg₂Cer) [18]. ST8Sia V человека демонстрирует более широкую ферментативную активность в отношении ганглиозидов, используя как G_{D3}, так и G_{M1b} (IV³Neu5Ac₁-Gg₄Cer), G_{D1a} (IV³Neu5Ac₁II³-Neu5Ac₁-Gg₄Cer) или G_{T1b} (IV³Neu5Ac₁II³-Neu5Ac₂-Gg₄Cer) в качестве акцепторов [19]. Таким образом, LacCer, G_{M3}, G_{D3} и G_{T3} являются предшественниками 0-, а-, b- и с-серий ганглиозидов соответственно [10], и биосинтез этих соединений определяет относительное соотношение ганглиозидов в каждой серии (рис. 1).

На следующих стадиях β 1,4-N-ацетил-галактозаминилтрансфераза I (G_{M2}/G_{D2}-синтаза) [20], β 1,3-галактозилтрансфераза IV [21] и различные сиалилтрансферазы (рис. 1) могут последовательно переносить остатки GalNAc, Gal и Neu5Ac. β 1,4-N-ацетил-галактозаминилтрансфераза I активна в четырех сериях ганглиозидов и превращает LacCer, G_{M3}, G_{D3} и G_{T3} в G_{A2} (асило-G_{M2}), G_{M2}, G_{D2} и G_{T2} соответственно [22, 23]. Аналогичным образом β 1,3-галактозилтрансфераза IV использует G_{A2}, G_{M2}, G_{D2} и G_{T2} в качестве акцепторов [22]. Терминальный остаток Gal может в дальнейшем использоваться как акцептор α 2,3-сиалилтрансферазой. Было показано, что как ST3Gal I, так и ST3Gal II переносят остаток сиаловой кислоты на дисахаридную последовательность Gal β 1-3GalNAc [24, 25]. При этом исходя из кинетических параметров и распределения в тканях, похоже, что основной вклад в терминальное α 2,3-сиалилирование ганглиозида вносит ST3Gal II [26]. Наконец, терминальный трисахарид Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GalNAc может быть затем замещен еще одним остатком сиаловой кислоты через α 2,8-связь ST8Sia V [19] или через α 2,6-связь к остатку GalNAc в G_{M1b}, G_{D1a} или G_{T1b} (рис. 1) с образованием ганглиозидов α -серии. Было показано, что три члена семейства CMP-Neu5Ac: β -N-ацетил-галактозаминид α 2,6-сиалилтрансфераз (ST6GalNAc III, V и VI) катализируют *in vitro* перенос остатков сиаловых кислот на G_{M1b} (IV³Neu5Ac₁Gg₄Cer) с образованием G_{D1a} [27]. Однако исходя из специфичности к субстратам и характера экспрессии, основным ферментом, образующим ганглиозиды α -серии, считают ST6GalNAc V [28].

Нормальные ткани человека экспрессируют «простые» ганглиозиды 0- и а-серий, в то время как «сложные» ганглиозиды b- и с-серий практически не встречаются нигде кроме нервных клеток здорового взрослого человека, но могут повторно экспрессироваться при некоторых типах рака, включая меланому и опухоли мозга [29]. Ферменты, участвующие в биосинтезе ганглиозидов, являются типичными гликозилтрансферазами типа II, заякоренными в мембране (ГТ),

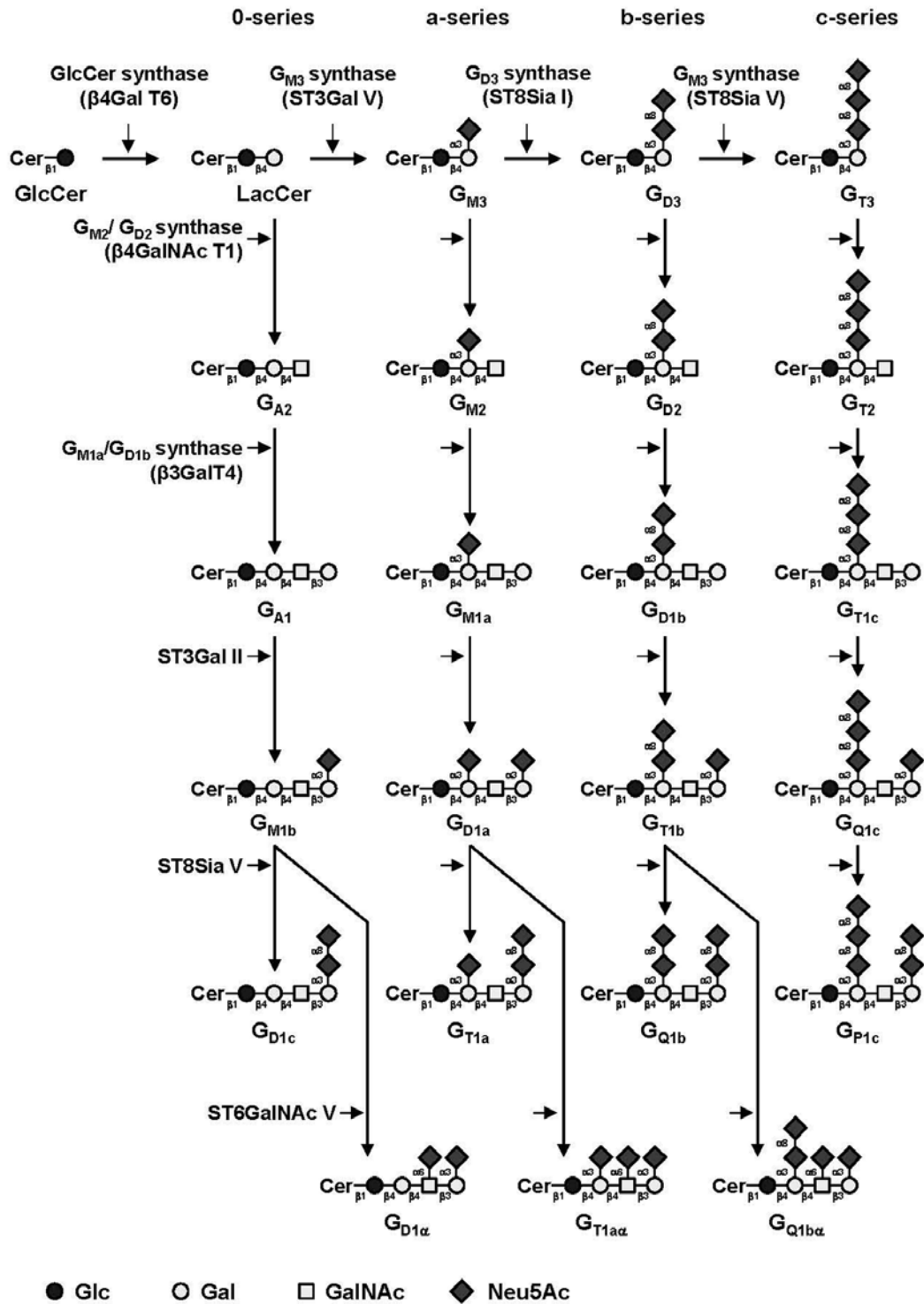


Рис. 1. Пути биосинтеза ганглиозидов. Ганглиозиды синтезируются путем последовательного присоединения моносахаридов к керамиду. Церамид (Cer) является акцептором для UDP-Glc: керамид β-D-глюкозилтрансферазы. Надстройка GlcCer происходит под действием UDP-Gal: GlcCer β1,4-галактозилтрансферазы с образованием лактозилцерамида (G_{A3}). Действие ST3Gal V (G_{M3}-синтазы), ST8Sia I (G_{D3}-синтазы) и ST8Sia V (G_{T3}-синтазы) приводит к биосинтезу предшественников α-, b- и c-серий ганглиозидов соответственно. Ганглиозиды 0-серии синтезируются напрямую из лактозилцерамида. Удлинение цепи происходит в результате последовательного действия N-ацетилгалактозаминилтрансферазы (β4GalNAc T1), галактозилтрансферазы (β3Gal T4) и сиалилтрансфераз (ST3Gal II и ST8Sia V). Ганглиозиды α-серии синтезируются в результате действия ST6GalNAc V на G_{M1b}, G_{D1a} или G_{T1b}. Кодовые названия ганглиозидов приведены по Свеннерхолму [10]

с градиентом распределения внутри аппарата Гольджи, образующими функциональные комплексы, подобные описанным для LacCer-синтазы, G_{M3} -синтазы и G_{D3} -синтазы в мультиферментном комплексе в *cis*-Гольджи [30]. Предполагается, что эти комплексы действуют без высвобождения промежуточных структур, что позволяет гарантировать биосинтез четко определенных ганглиозидов в качестве конечных продуктов. Регуляция ГТ, участвующих в синтезе ганглиозидов, в основном происходит на уровне транскрипции, кроме того, экспрессия генов ГТ является тканеспецифичной. Например, ген *B4GALNACT1*, как правило, экспрессируется в мозгу человека, легких и яйцках, в то время как *ST3GAL5* – во всех тканях человека [16, 31].

ПОСЛЕДНИЕ ДОСТИЖЕНИЯ В МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ ГСЛ

Несмотря на присущее им структурное разнообразие, все ГСЛ можно разделять с использованием широкого набора хроматографических методов. После выделения гомогенной фракции ганглиозидов в 1940-х гг. большинство разработанных протоколов очистки было основано на использовании экстракции органическими растворителями и в последнее время существенно не дорабатывалось. Они подробно описаны в работах Шнаар [32] и Хакомори [33]. Большинство используемых в наши дни протоколов, таких как метод Свеннерхольма и Фредмана [34], используют амфифильную природу гликофинголипидов для экстракции из тканей и клеток с помощью монофазных или двухфазных смесей хлороформа, метанола и воды. Применяют также другие растворители, такие как тетрагидрофуран, эфир или бутанол, иногда с добавками солей (как правило, KCl или фосфатов) для улучшения выхода экстракции наиболее полярных соединений, таких как сульфатированные сиалилированные гликолипиды [35]. Кроме того, для дополнительной очистки и 3D-разделения гликофинголипидов можно использовать целый ряд хроматографических методов, включая анионообменную хроматографию (DEAE-Sephadex, Q-Sepharose и т.д.) или обращенную фазу. 3D-разделение можно совместить со слабой щелочной сапонификацией для очистки от триглицеридов, но при этом будут утрачены лабильные в щелочной среде группы, такие как ацетаты.

Большинство последних открытий сделано в аналитической области, а их движущей силой было быстрое развитие и распространение в ис-

следовательских лабораториях технологий, связанных с масс-спектрометрией (MS). Постоянное улучшение разрешения, чувствительности и скорости анализа методами масс-спектрометрии не только радикально улучшило надежность структурного анализа, но и позволило реализовать некоторые новые подходы. Основной технической сложностью при использовании MS для анализа ГСЛ является присущее им разнообразие, связанное как с липидной, так и с углеводной частями, а также их амфифильный характер. В рамках данного обзора мы сосредоточимся на недавно разработанных подходах, которые позволяют преодолеть эти трудности.

MALDI-MS. По сравнению с жидкими источниками источники MALDI позволяют разрешить все проблемы, связанные с использованием органических растворителей, путем сокращения кристаллизации соединений и матрицы, благодаря чему они быстро стали основными методами анализа ГСЛ. Однако серьезный процент потерь сиаловых кислот ганглиозидами и другими сиалилированными ГСЛ во время десорбции с помощью лазера долгое время создавал проблемы для аналитиков. Одним из способов стабилизации сиаловых кислот является эстерификация их карбоксильных групп [36, 37] или перметилирование молекул [38]. При этом перметилирование не только обеспечивает одновременную и количественную регистрацию профилей как нейтральных, так и отрицательно заряженных сиалилированных соединений без потери сиаловых кислот [39], но и приводит к более информативной фрагментации гликанов в спектрах CID MS/MS, нежели для неперметилированных гликанов. Параллельно с этим усилия исследователей были сосредоточены на проверке большого числа так называемых «холодных» матриц для минимизации расщепления очень лабильных гликозидных связей без химической модификации ГСЛ. Было показано, что многочисленные матрицы на основе сухих капель или ионных жидкостей приводят к меньшей фрагментации ганглиозидов, нежели 2,5-дигидроксibenзойная кислота (DHB). Это справедливо, например, для 5-метоксисалициловой кислоты (MSA), матрицы, приготовленной из 2,9-дигидроксиацетофенона (DHA)/сульфата аммония/гептафтормасляной кислоты (HFBA) или из бутиламина 2,5-дигидроксibenзойной кислоты (DHBV), которые позволяют получать спектры ганглиозидов более высокого качества, нежели с DHB [40–42].

Визуализация тканей. Масс-спектрометрия с визуализацией (Imaging Mass Spectrometry, IMS) с использованием технологии MALDI-MS недавно стала мощным методом визуализации не-

меченых биомолекул, включая гликофинголипиды, на срезах тканей. На настоящий момент большинство MALDI IMS масс-спектрометров обладают горизонтальным разрешением 10–50 мкм. По сравнению с классическим гистохимическим анализом метод позволяет различать ганглиозиды не только по их олигосахаридным частям, но также и по природе их керамидов. Более того, использование тандемной масс-спектрометрии позволяет получить детальную информацию о структуре ганглиозидов. Для классической MALDI–MS были предприняты усилия для замены первоначально использовавшейся матрицы DHB [43] более холодными матрицами для минимизации потери сиаловых кислот из ганглиозидов [41, 44, 45]. Альтернативным способом решения проблемы стали более мягкие, чем MALDI, методы ионизации, включая недавно разработанный метод ионизации лазерным рассеянием на входе (Laserspray Ionization Inlet, LSII), который доказал свою полезность в области IMS в экспериментах по визуализации дисиалилированного GD1 без видимой фрагментации [46]. Эти технологические достижения позволили нескольким группам убедительно продемонстрировать, что ганглиозиды по-разному распределяются в мозгу мышей в различных патологических условиях и условиях внешней среды [43, 47]. Наконец, дальнейшие исследования показали, что горизонтальное разрешение MALDI-визуализации ганглиозидов может быть понижено до 10 мкм путем использования метода сверхразвертки, что делает возможным достижение клеточного разрешения уже в ближайшем будущем [48, 49].

Сочетание ТСХ–MS. Ни одному из аналитических методов не удалось достичь столь долговременного успеха в области структурного анализа ГСЛ, как тонкослойной хроматографии (ТСХ). Она обладает целым рядом преимуществ по сравнению с ВЭЖХ, такими как экономичность, простота, сравнение одиночных анализов и количественная оценка методом колориметрии. В лабораторной практике очень легко реализовать воспроизводимое разделение нейтральных и сиалилированных ГСЛ с высоким разрешением на пластинках с силикагелем 60 НРТС после проявки хлороформом/метанолом/водой (например, 65 : 25 : 4, v/v/v) или хлороформом/метанолом/0,2%-ным CaCl₂ (например, 60 : 42 : 10, v/v/v). Благодаря этому данный метод на протяжении десятилетий использовался как для аналитических целей с использованием стандартов ГСЛ, так и для препаративных целей. Учитывая широкую распространенность данного метода, изначально были разработаны пути объединения ТСХ- и MS-анализов, однако

при этом возникли технологические сложности, связанные с эффективной экстракцией ГСЛ из неподвижной фазы для введения в масс-спектрометр. Наиболее свежие данные о разработке интерфейса ТСХ–MS читатели могут найти в недавней публикации Ченг с соавт. [50].

Более ранний способ сбора ГСЛ для MS-анализа включал соскабливание неподвижной фазы (в основном силикагеля для ГСЛ) и элюирование молекул органическими растворителями. Хотя этот метод и обладает многочисленными недостатками (низкий выход, большие трудозатраты, ограниченность только основными компонентами), он до сих пор используется для получения высококачественных структурных данных [51]. Прямой отбор ГСЛ с ТСХ в источник MALDI был разработан очень давно, но его применение ограничено нейтральными ГСЛ [52, 53] из-за высокого риска потери сиаловых кислот в процессе десорбции лазером. Предложенный альтернативный подход с использованием блоттинга ганглиозидов на PVDF-мембранах после разделения на ТСХ выглядел многообещающе, но тоже привел к десиалилированию [54]. Однако потери сиаловых кислот могут быть минимизированы при использовании специальных устройств, таких как ортогональное или вибрационное охлаждение источников MALDI [55, 56]. Тем не менее требования к высокотехнологичному оборудованию существенно снижают широту распространения этого метода для анализа ганглиозидов, сводя ее к нескольким специализированным лабораториям.

Среди новых разработок интерфейса ТСХ–MS для анализа ганглиозидов наиболее многообещающим выглядит соединение коммерчески доступных автоматизированных устройств жидкостной поверхностной экстракции с электро-распыляющим источником ионизации [57]. Две системы поверхностной экстракции, а именно ТСХ–MS-интерфейс от CAMAG Liquid Extraction Surface Analysis («LESA[®]», «CAMAG», Швейцария), продемонстрировали способность к надежной полуавтоматизированной экстракции ганглиозидов, которые могут вводиться в Q-q-TOF масс-спектрометр в режиме онлайн для анализа методами MS и MS/MS. Благодаря тому, что эта процедура ионизации более мягкая, чем MALDI–MS, ганглиозиды можно наблюдать с минимальной фрагментацией, что открывает широкие возможности для ТСХ–ESI–MS-анализа ганглиозидов.

ЖХ–ESI–MS. Как сказано выше, ESI–MS может считаться оптимальным методом для мягкой ионизации ганглиозидов, и она широко использовалась для структурного анализа ГСЛ. Хотя этот метод и позволяет достичь лучшей

чувствительности и селективности по сравнению с технологиями, основанными на ТСХ, использование ЖХ–ESI–MS для изучения ганглиозидов долго отставало от исследования других биомолекул (пептидов, олигосахаридов и т.д.) из-за отсутствия достаточного разрешения у колонок для жидкостной хроматографии ганглиозидов. Тем не менее в нескольких исследованиях описано использование ЖХ–MS для идентификации и количественной оценки ганглиозидов из комплексных биологических матриц, таких как молочные продукты [58], плазма человека [59] или мозг крыс [60], с использованием колонок с обращенной или нормальной фазой. Недавний прогресс в ЖХ–MS-анализе ганглиозидов сосредоточен на использовании нано-ВЭЖХ-чипов, которые могут обеспечить высокую воспроизводимость времени удерживания и относительного содержания [61], и на быстрой сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии в тандеме с масс-спектрометрией (UPLC–MS) [62].

ST8Sia I ЯВЛЯЕТСЯ КЛЮЧЕВЫМ ФЕРМЕНТОМ В БИОСИНТЕЗЕ b- И c-СЕРИЙ ГАНГЛИОЗИДОВ

ST8Sia I – единственная сиалилтрансфераза, катализирующая перенос остатка сиаловой кислоты на G_{M3} через $\alpha 2,8$ -связь в синтезе G_{D3} . Хотя ST8Sia I в основном сиалилирует G_{M3} , было показано, что она также способна синтезировать G_{T3} из G_{D3} и необычные тетра- и пентасиалированные лактозилцерамидные производные G_{Q3} ($\text{II}^3\text{Neu5Ac}_4\text{-Gg}_2\text{Cer}$) и G_{P3} ($\text{II}^3\text{Neu5Ac}_5\text{-Gg}_2\text{Cer}$) [18, 63]. Было также показано, что ST8Sia I использует G_{M1b} , G_{D1a} или G_{T1b} в качестве акцепторов для синтеза G_{D1c} , G_{T1a} или G_{Q1b} соответственно как *in vitro*, так и *in vivo* [64]. Однако $\alpha 2,8$ -сиалилтрансфераза ST8Sia V более подходит в качестве кандидата для активности G_{T1a}/G_{Q1b} -синтазы [19], в то время как для G_{M3} не было выявлено активности ST8Sia V. Таким образом, считается, что ST8Sia I является единственной GD3S, контролирующей биосинтез b- и c-серий ганглиозидов.

GD3S кДНК человека была одновременно выделена тремя исследовательскими группами [17, 65, 66]. Ген *ST8SIA1* расположен на хромосоме 12 в p12.1–p11.2 и состоит из пяти кодирующих экзонов (E1–E5), занимающих более 135 т.п.н. геномной ДНК [67]. Ген *ST8SIA1* кодирует типичный белок типа II из 341 а.о. с цитоплазматическим хвостом из 12 а.о., трансмембранного домена из ~20 остатков и каталитического домена Гольджи, содержащего кон-

сервативные сиалил-мотивы, участвующие в связывании и переносе субстрата [27]. GD3S экспрессируется в мозге эмбриона на ранних стадиях развития, в которых ганглиозиды играют ключевую роль в межклеточном взаимодействии, дифференцировке клеток и пролиферации [68, 69]. В тканях взрослого человека транскрипты GD3S в основном обнаруживаются в мозге [18]. Было также показано, что GD3S сверхэкспрессируется в полученных из нейроктодермы злокачественных опухолях, таких как меланома, глиобластома и нейробластома [29]. Промоторная область, контролирующая экспрессию гена *ST8SIA1*, не содержит ТАТА- или ССААТ-блока, что часто встречается в генах ГТ, но содержит несколько сайтов SP1. Анализ изменения электрофоретической подвижности (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA) и эксперименты по мутагенезу выявили ключевую роль NF κ B в активации экспрессии *ST8SIA1* в клетках меланомы [70], на клетках глиобластомы была также показана важная роль факторов транскрипции AREB6 и Elk-1 в экспрессии *ST8SIA1* [71].

ДИСИАЛОГАНГЛИОЗИДЫ И РАК МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Было показано, что опухолевые ткани молочной железы отличаются от нормальных тканей по составу ганглиозидов. Ганглиозиды G_{M3} , G_{D3} , их производные 9-О-ацетил- G_{D3} (CDw60 антиген) и 9-О-ацетил- G_{T3} , которые обладают крайне ограниченной экспрессией в нормальных тканях молочной железы, сверхэкспрессируются в ~50% инфильтративно-протоковой карциномы [72]. N-гликоил- G_{M3} также обнаружен в 100% рака молочной железы 2-й стадии [73]. Из-за необратимой инактивации гена *СМАН*, кодирующего CMP-Neu5Ac гидроксилазу, в организме человека обычно отсутствует Neu5Gc. Отсутствие фермента, ответственного за превращение CMP-Neu5Ac в CMP-Neu5Gc, приводит к полному отсутствию Neu5Gc в здоровых тканях человека. Наоборот, было показано, что Neu5Gc экспрессируется на гликопротеинах и ганглиозидах в клетках меланомы, ретинобластомы, рака толстой кишки и молочной железы.

Экспрессия ГТ, предположительно участвующих в биосинтезе ганглиозидов, в опухолях рака молочной железы также изменена. Микроматричный анализ более тысячи образцов опухолей из различных подтипов рака молочной железы показал, что GD3S обладает более высокой экспрессией в отрицательных к рецептору

эстрогена (ЭР) раковых опухолях молочной железы [74]. Сверхэкспрессия *ST8SIA1* связана с плохой патогистологической оценкой в ЭР-отрицательных опухолях и более низкой долей выживаемости пациентов [75]. Наоборот, описан лучший прогноз для ЭР-положительных образцов, демонстрирующих высокую экспрессию *ST8SIA1* [75]. Также было показано, что уровень GD3S повышается в 5 раз в клеточной линии MDA-MB-231 варианта рака молочной железы, который колонизирует кость [76]. Было показано, что подавление экспрессии G_{M3} -синтазы в клетках молочных желез мышей линии 4T1 существенно снижает миграцию клеток, инфильтрацию и независимый от фиксации рост *in vitro*, а также метастазы в легких *in vivo*. Одновременно с этим сверхэкспрессия G_{M3} -синтазы в нематастатических клетках 67NR в существенной степени восстанавливает злокачественный фенотип [77].

Недавние исследования проливают свет на важную роль дисиаialogанглиозида G_{D2} в раке молочной железы. Экспрессия GD3S в клетках MDA-MB-231 рака молочной железы индуцирует накопление ганглиозидов b- и c-серий (G_{D3} , G_{D2} и G_{T3}) на клеточной поверхности одновременно с приобретением пролиферативного фенотипа в отсутствие сывороточных или экзогенных факторов роста [78]. Клетки, экспрессирующие GD3S, не нуждаются в факторах роста для роста клеток в результате специфической и постоянной активации путей рецептора c-Met в отсутствие его лиганда, HGF/SF, и активации фосфоинозитид 3-киназы (PI3K)/Akt и регулируемой внеклеточными сигналами киназы (Erk)/митоген-активируемой протеинкиназы (MAPK) [79]. Экспрессия GD3S также усиливает рост опухоли у мышей с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (severe combined immunodeficient, SCID); также наблюдалась более высокая экспрессия *ST8SIA1* и *MET* в базально-подобных подтипах опухолей молочной железы у человека [79]. Снижение экспрессии G_{D2} путем отключения G_{M2}/G_{D2} -синтаз малыми интерферирующими РНК (миРНК) обращало пролиферативный фенотип, а также фосфорилирование c-Met; кроме того, моноклональные антитела к G_{D2} конкурентно ингибировали пролиферацию клеток и фосфорилирование c-Met [80] (рис. 2), что указывает на участие дисиаialogанглиозида G_{D2} в пролиферации клеток MDA-MB-231 через постоянную активацию c-Met. Таким образом, накопление G_{D2} в клетках, экспрессирующих c-Met, может усиливать канцерогенность и агрессивность опухолей рака молочной железы.

Ганглиозид G_{D2} был недавно идентифицирован в качестве нового специфического маркера

клеточной поверхности стволовых клеток рака молочной железы $CD44^{hi}CD24^{lo}$ (CSC) в клеточной линии рака молочной железы человека из образцов от пациентов, способных к образованию маммосфер и инициации опухолей [81]. Анализ экспрессии генов показал, что несколько генов ГТ, участвующих в биосинтезе G_{D2} (*ST3GAL5*, *BAGALNT1* и *ST8SIA1*), экспрессируется в CSC в больших количествах [81, 82]. Снижение экспрессии G_{D2} в результате нокдаун *ST8SIA1* снижает образование маммосфер, подвижность клеток и полностью устраняет образование опухолей *in vivo*, меняя фенотип с CSC на не-CSC [81, 82]. Более того, индукция эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) в трансформированных клетках эпителия молочной железы человека радикально повышало экспрессию GD3S и G_{D2} , в то время как ингибирование GD3S компрометирует инициацию и поддержание ЭМП и предотвращает образование метастазов [83]. Поскольку экспрессия GD3S коррелирует с постоянной активацией сигнального пути c-Met, приводя к усилению свойств стволовых клеток и метастатической компетенции, ось GD3S/c-Met может служить эффективной мишенью для терапии метастатического рака молочной железы.

ГАНГЛИОЗИДЫ α -СЕРИИ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Ганглиозиды α -серии представляют собой особый подкласс ГСЛ, содержащий остаток Neu5Ac, $\alpha 2,6$ -связанный с GalNAc в основной ганглиопентаозильной цепи Neu5Ac $\alpha 2$ -3Gal $\beta 1$ -3GalNAc $\beta 1$ -4Gal $\beta 1$ -4Glc β (IV³Neu5Ac₁Gg₄). Типичные ганглиозиды α -серии $G_{D1\alpha}$ (IV³Neu5Ac₁, III⁶Neu5Ac₁Gg₄-Cer) были впервые выделены в качестве минорных соединений из клеток асцитов гепатомы крыс АН 7974F [84] и мозга коров [85] с экспрессией, ограниченной конкретными популяциями клеток из переднего и среднего мозга и мозжечка [86]. Среди сиалилтрансфераз ST6GalNAc, как правило, основной $G_{D1\alpha}$ -синтазой, катализирующей перенос остатка сиаловой кислоты на G_{M1b} (IV³Neu5Ac₁Gg₄-Cer) с образованием $G_{D1\alpha}$, считается ST6GalNAc V. Была клонирована кДНК ST6GalNAc V из мозга мышей [28, 87], а в тканях мозга специфично экспрессировался ген *st6galnac5*, в основном в переднем мозге и мозжечке [87]. При экспрессии в виде растворимых рекомбинантных белков ST6GalNAc V мышей демонстрировал активность $\alpha 2,6$ -сиалилтрансферазы практически исключительно в отношении G_{M1b} и отсутствие активности в отношении гликопротеинов [28]. Однако было по-

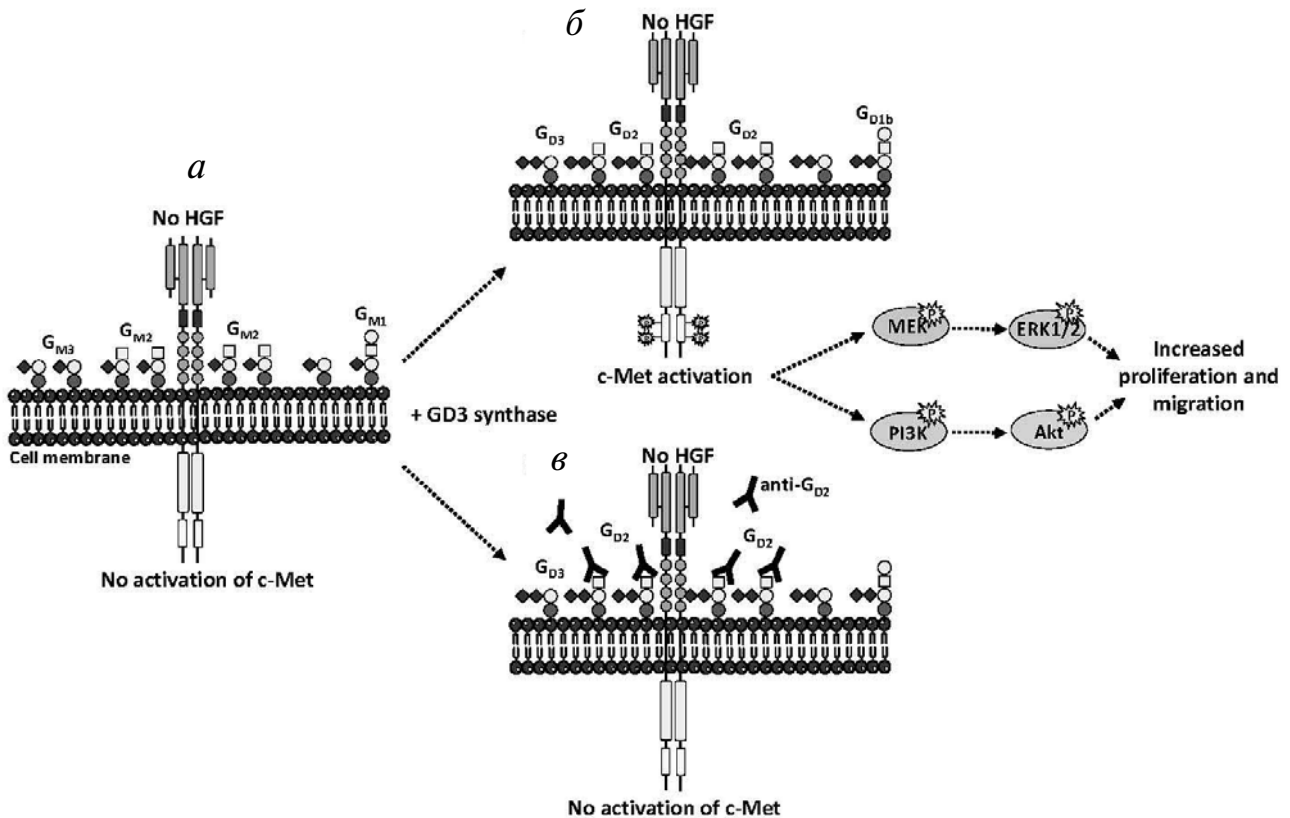


Рис. 2. Активация c-Met ганглиозидом G_{D2} . *a* – Клетки рака молочной железы MDA-MB-231 экспрессируют в основном G_{M3} и G_{M2} ; *б* – экспрессия GD3S индуцирует накопление ганглиозидов b- и c-серий, в основном G_{D2} . Это приводит к активации c-Met в отсутствие HGF и увеличивает пролиферацию и миграцию по путям PI3K/Akt и MEK/Erk; *в* – анти- G_{D2} МАт, используемое в конкурентном анализе, ингибирует фосфорилирование c-Met и пролиферацию клеток [79, 80]

казано, что трансфицирование ST6GalNAc V человека в клетки глиомы U373MG производили необычные $\alpha 2,6$ -моносиалоганглиозиды $G_{M2\alpha}$ (Neu5Ac $\alpha 2$ -6GalNAc $\beta 1$ -4Gal $\beta 1$ -4Glc $\beta 1$ -Cer, III⁶Neu5Ac₃Gg₃-Cer) вместо $G_{D1\alpha}$ [88].

На настоящий момент мало что известно о специфической функции ганглиозидов α -серии, но недавние свидетельства указывают на возможную роль в адгезии клеток рака к эндотелию. В высокометастатической клеточной линии лимфосаркомы мышей RAW117-H10 $G_{D1\alpha}$ выступает в роли молекул адгезии к синусоидальным клеткам эндотелия печени (HSE) [89]. Инкубация с олигосахаридом $G_{D1\alpha}$ или с анти- $G_{D1\alpha}$ моноклональным антителом ингибирует адгезию между клетками RAW117-H10 и HSE. Недавно было показано, что *ST6GALNAC5* является одним из генов, сверхэкспрессирующихся в популяции клеток рака молочной железы, отобранных на основании их способности образовывать метастазы в мозг [90]. Ингибирование *ST6GALNAC5* короткой шпилечной РНК (шРНК) снижает способность клеток рака молочной же-

лезы образовывать метастазы в мозг, в то время как экспрессия *ST6GALNAC5* в родительских клетках опосредует метастазы в мозг [90]. Также было показано, что экспрессия ST6GalNAc V усиливает адгезию клеток рака молочной железы к эндотелию мозга и прохождение через гематоэнцефалический барьер; более того, *ST6GALNAC5* – единственный ген, который специфически связан с метастазами в мозг рака молочной железы и более активно экспрессируется в образцах метастазов в мозг человека. Однако способность клеток рака молочной железы человека, экспрессирующих *ST6GALNAC5*, продуцировать ганглиозиды α -серии все еще не была явно продемонстрирована.

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ

Были разработаны инновационные терапевтические инструменты, основанные на использовании моноклональных антител (МАт) анти-опухолевых ганглиозидов, которые в настоящий

момент изучаются в рамках доклинических и клинических исследований, особенно для рака, связанного с нейроэктодермой (меланома, нейробластома, мелкоклеточный рак легких) [7, 8]. Так, например, клинические исследования анти- G_{D2} в терапии нейробластомы подтвердили эффективность иммунотерапии анти- G_{D2} -антителами для этого редкого, но часто смертельного детского рака [91]. Ракотумомаб, антиидиотипическое антитело, зарегистрированное под торговым названием Vaxira [92], и Neu5Gc- G_{M3} /VSSP, ганглиозид Neu5Gc- G_M , конъюгированный с протеолипосомами, продемонстрировали свою эффективность при лечении пациентов с меланомами на поздних стадиях [93] и немелкоклеточным раком легких [94]. До настоящего момента в клинических исследованиях не изучали возможность использования противоганглиозидных антител при терапии рака молочной железы. Только одно клиническое исследование фазы I показало, что антитело 14F7, специфическое к Neu5Gc- G_{M3} , может воздействовать на карциному молочной железы [73]. Показанная недавно роль оси G_{D2} – Met в агрессивности ЭР-негативного рака молочной железы подтверждает, что против- G_{D2} иммунотерапевтический подход может быть полезен при терапии рака молочной железы. Одновременно с этим недавно полученные данные также указывают на то, что с-Met сам по себе может быть ценной терапевтической мишенью для трижды негативного рака молочной железы, т.к. высокая экспрессия с-Met при раке молочной железы коррелирует с плохой общей выживаемостью ($p = 0,001$) и выживаемостью без болезни ($p = 0,01$) [95]. Кроме того, экспрессия с-Met в клеточных линиях трижды негативного рака молочной железы достаточно высока, а ее отключение с помощью миРНК приводит к снижению пролиферации и миграции клеток [95]. Другие результаты показывают, что микроРНК miR-185, экспрессия которой в тканях рака молочной железы подавлена, ингибировала пролиферацию клеток рака молочной железы путем регуляции экспрессии с-Met, что подтверждает ее потенциал в качестве терапевтической мишени при раке молочной железы [96]. Как отмечалось ранее, экспрессия GD3S и генерированного ганглиозид G_{D2} коррелирует с постоянной активацией сигнального пути с-Met, приводящей к увеличению образования метастазов клетками рака молочной железы. Сверхэкспрессия G_{D2} усиливает свойства стволовых клеток и может отвечать за агрессивную природу трижды негативного рака

молочной железы и плохие наблюдаемые клинические исходы, что позволяет предположить, что ось GD3S и с-Met может быть синергетически использована для терапии метастатического рака молочной железы [83] с использованием, например, анти-Met и анти- G_{D2} мАт. Благодаря ограниченному распределению в нормальных тканях было доказано, что ганглиозид G_{D2} представляет собой безопасную мишень для мАт, и терапия анти- G_{D2} мАт в настоящее время является частью стандартного лечения метастатических нейробластом с высоким риском [97]. Поскольку как G_{D2} , так и с-Met экспрессируются независимо целым рядом здоровых клеток и одновременно только в незначительном числе органов, можно полагать, что их сочетание является специфическим для рака событием. В ожидании подтверждения упомянутого выше факта пара G_{D2} /с-Met может также считаться интересной мишенью для противораковых биспецифических мАт [98]. Другой стратегией, направленной на ось GD3S/с-Met, может быть использование специфических ингибиторов обеих мишеней.

Наконец, в терапии рака может также применяться фармакологический подход, нацеленный на пути биосинтеза ганглиозидов. Например, триптолид является ингибитором экспрессии GD3S, обладающим высокой цитотоксичностью в отношении стволовых клеток рака молочной железы человека и первичных клеток рака молочной железы *in vitro* и *in vivo*, что позволяет предположить, что природный дитерпеноидный триэпоксид из *Tripterygium wilfordii* может иметь клиническое применение для подавления роста опухоли молочной железы [99]. Кроме того, результаты, недавно полученные Саркар с соавт., показали, что ингибирование GD3S с использованием шРНК или тритолида снижало метастатическую нагрузку у мышей и первичный рост опухоли, что опять же позволяет предположить, что эта молекула может представлять большой интерес для терапии трижды негативного рака молочной железы, а также в качестве мишени опухолей, обогащенных раковыми стволовыми клетками [83]. Продолжающиеся клинические исследования триптолида и разработка новых специфических ингибиторов GD3S выглядят многообещающе для терапии рака молочной железы.

Исследование выполнено при поддержке Университета наук и технологий Лилля, CNRS и Противоракового комитета Па-де-Кале де Ла Линь.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hakomori, S.I. (2002) The glycosynapse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 225–232.
- Regina Todeschini, A., and Hakomori, S.I. (2008) Functional role of glycosphingolipids and gangliosides in control of cell adhesion, motility, and growth, through glycosynaptic microdomains, *Biochim. Biophys. Acta*, **1780**, 421–433.
- Birkle, S., Zeng, G., Gao, L., Yu, R.K., and Aubry, J. (2003) Role of tumor-associated gangliosides in cancer progression, *Biochimie*, **85**, 455–463.
- Prokazova, N.V., and Bergelson, L.D. (1994) Gangliosides and atherosclerosis, *Lipids*, **29**, 1–5.
- Ariga, T., McDonald, M.P., and Yu, R.K. (2008) Role of ganglioside metabolism in the pathogenesis of Alzheimer's disease – a review, *J. Lipid Res.*, **49**, 1157–1175.
- Furukawa, K., Hamamura, K., Aixinjueluo, W., and Furukawa, K. (2006) Biosignals modulated by tumor-associated carbohydrate antigens: novel targets for cancer therapy, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1086**, 185–198.
- Krengel, U., and Bousquet, P.A. (2014) Molecular recognition of gangliosides and their potential for cancer immunotherapies, *Front. Immunol.*, **5**, 325.
- Rabu, C., McIntosh, R., Jurasova, Z., and Durrant, L. (2012) Glycans as targets for therapeutic antitumor antibodies, *Future Oncol.*, **8**, 943–960.
- Yu, R.K., Yanagisawa, M., and Ariga, T. (2007) Glycosphingolipid structures, in *Comprehensive glycoscience* (Kamerling, H., ed.), Elsevier, Oxford, UK, pp. 73–122.
- Svennerholm, L. (1980) Ganglioside designation, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **125**, 11.
- Ichikawa, S., Sakiyama, H., Suzuki, G., Hidari, K.I., and Hirabayashi, Y. (1996) Expression cloning of a cDNA for human ceramide glucosyltransferase that catalyzes the first glycosylation step of glycosphingolipid synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 4638–4643.
- Abe, A., Inokuchi, J., Jimbo, M., Shimeno, H., Nagamatsu, A., and Shayman, J.A., Shukla, G.S., and Radin, N.S. (1992) Improved inhibitors of glucosylceramide synthase, *J. Biochem.*, **111**, 191–196.
- Nomura, T., Takizawa, M., Aoki, J., Arai, H., Inoue, K., Wakisaka, E., Yoshizuka, N., Imokawa, G., Dohmae, N., Takio, K., Hattori, M., and Matsuo, N. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 13570–13577.
- Takizawa, M., Nomura, T., Wakisaka, E., Yoshizuka, N., Aoki, J., Arai, H., Inoue, K., Hattori, M., and Matsuo, N. (1999) cDNA cloning and expression of human lactosylceramide synthase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1438**, 301–304.
- Zeng, G., and Yu, R.K. (2008) Cloning and transcriptional regulation of genes responsible for synthesis of gangliosides, *Curr. Drug Targets*, **9**, 317–324.
- Ishii, A., Ohta, M., Watanabe, Y., Matsuda, K., Ishiyama, K., Sakoe, K., Nakamura, M., Inokuchi, J., Sanai, Y., and Saito, M. (1998) Expression cloning and functional characterization of human cDNA for ganglioside GM3 synthase, *J. Biol. Chem.*, **273**, 31652–31655.
- Haraguchi, M., Yamashiro, S., Yamamoto, A., Furukawa, K., Takamiya, K., Lloyd, K.O., Shiku, H., and Furukawa, K. (1994) Isolation of GD3 synthase gene by expression cloning of GM3 alpha-2,8-sialyltransferase cDNA using anti-GD2 monoclonal antibody, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 10455–10459.
- Nakayama, J., Fukuda, M.N., Hirabayashi, Y., Kanamori, A., Sasaki, K., Nishi, T., and Fukuda, M. (1996) Expression cloning of a human GT3 synthase. GD3 AND GT3 are synthesized by a single enzyme, *J. Biol. Chem.*, **271**, 3684–3691.
- Kim, Y.J., Kim, K.S., Do, S., Kim, C.H., Kim, S.K., and Lee, Y.C. (1997) Molecular cloning and expression of human alpha2,8-sialyltransferase (hST8Sia V), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **235**, 327–330.
- Nagata, Y., Yamashiro, S., Yodoi, J., Lloyd, K.O., Shiku, H., and Furukawa, K. (1992) Expression cloning of beta 1,4 N-acetylgalactosaminyltransferase cDNAs that determine the expression of GM2 and GD2 gangliosides, *J. Biol. Chem.*, **267**, 12082–12089.
- Amado, M., Almeida, R., Carneiro, F., Levery, S.B., Holmes, E.H., Nomoto, M., Hollingsworth, M.A., Hassan, H., Schwientek, T., Nielsen, P.A., Bennett, E.P., and Clausen, H. (1998) A family of human beta3-galactosyltransferases. Characterization of four members of a UDP-galactose: beta-N-acetyl-glucosamine/beta-nacetyl-galactosamine beta-1,3-galactosyltransferase family, *J. Biol. Chem.*, **273**, 12770–12778.
- Iber, H., Zacharias, C., and Sandhoff, K. (1992) The c-series gangliosides GT3, GT2 and GP1c are formed in rat liver Golgi by the same set of glycosyltransferases that catalyze the biosynthesis of asialo-, a- and b-series gangliosides, *Glycobiology*, **2**, 137–142.
- Yamashiro, S., Haraguchi, M., Furukawa, K., Takamiya, K., Yamamoto, A., Nagata, Y., Lloyd, K.O., Shiku, H., and Furukawa, K. (1995) Substrate specificity of beta 1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase *in vitro* and in cDNA-transfected cells. GM2/GD2 synthase efficiently generates asialo-GM2 in certain cells, *J. Biol. Chem.*, **270**, 6149–6155.
- Kitagawa, H., and Paulson, J.C. (1994) Cloning of a novel alpha 2,3-sialyltransferase that sialylates glycoprotein and glycolipid carbohydrate groups, *J. Biol. Chem.*, **269**, 1394–1401.
- Giordanengo, V., Bannwarth, S., Laffont, C., Van Miegden, V., Harduin-Lepers, A., Delannoy, P., and Lefebvre, J.C. (1997) Cloning and expression of cDNA for a human Gal(beta1-3)GalNAc alpha2,3-sialyltransferase from the CEM T-cell line, *Eur. J. Biochem.*, **247**, 558–566.
- Sturgill, E.R., Aoki, K., Lopez, P.H., Colacurcio, D., Vajn, K., Lorenzini, I., Majic, S., Yang, W.H., Heffer, M., Tiemeyer, M., Marth, J.D., and Schnaar, R.L. (2012) Biosynthesis of the major brain gangliosides GD1a and GT1b, *Glycobiology*, **22**, 1289–1301.
- Harduin-Lepers, A. (2013) Vertebrate sialyltransferases, in *Sialobiology: structure; biosynthesis and function sialic acid glycoconjugates in health and disease* (Tiralongo, J., and Martinez-Duncker, J.T., eds), Bentham Science Publishers, UAE, pp. 139–187.
- Okajima, T., Fukumoto, S., Ito, H., Kiso, M., Hirabayashi, Y., Urano, T., and Furukawa, K. (1999) Molecular cloning of brain-specific GD1alpha synthase (ST6GalNAc V) containing CAG/Glutamine repeats, *J. Biol. Chem.*, **274**, 30557–30562.
- Bobowski, M., Cazet, A., Steenackers, A., and Delannoy, P. (2012) Role of complex gangliosides in cancer progression, *Carbohydr. Chem.*, **37**, 1–20.
- Giraud, C.G., and Maccioni, H.J. (2003) Ganglioside glycosyltransferases organize in distinct multienzyme complexes in CHO-K1 cells, *J. Biol. Chem.*, **278**, 40262–40271.
- Hidari, J.K., Ichikawa, S., Furukawa, K., Yamasaki, M., and Hirabayashi, Y. (1994) beta 1-4N-acetylgalactosaminyltransferase can synthesize both asialoglycosphingolipid GM2 and glycosphingolipid GM2 *in vitro* and *in vivo*: isolation and characterization of a beta 1-4N-acetylgalactosaminyltransferase cDNA clone from rat ascites hepatoma cell line AH7974F, *Biochem. J.*, **303**, 957–965.

32. Schnaar, R.L. (1994) Isolation of glycosphingolipids, *Methods Enzymol.*, **230**, 348–370.
33. Hakomori, S.I. (1983) Chemistry of glycosphingolipids, in *Sphingolipid biochemistry – handbook of lipid research* (Kanfer, J.N., and Hakomori, S.I., eds), Plenum Press, N.Y., pp. 1–165.
34. Svennerholm, L., and Fredman, P. (1980) A procedure for the quantitative isolation of brain gangliosides, *Biochim. Biophys. Acta*, **617**, 97–109.
35. Ijuin, T., Kitajima, K., Song, Y., Kitazume, S., Inoue, S., Haslam, S.M., Morris, H.R., Dell, A., and Inoue, Y. (1996) Isolation and identification of novel sulfated and nonsulfated oligosialyl glycosphingolipids from sea urchin sperm, *Glycoconj. J.*, **13**, 401–413.
36. Powell, A.K., and Harvey, D.J. (1996) Stabilization of sialic acids in N-linked oligosaccharides and gangliosides for analysis by positive ion matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **10**, 1027–1032.
37. Wheeler, S.F., Domann, P., and Harvey, D.J. (2009) Derivatization of sialic acids for stabilization in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and concomitant differentiation of alpha(2→3)- and alpha(2→6)-isomers, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **23**, 303–312.
38. Liang, Y.J., Kuo, H.H., Lin, C.H., Chen, Y.Y., Yang, B.C., Cheng, Y.Y., Yu, A.L., Khoo, K.H., and Yu, J. (2010) Switching of the core structures of glycosphingolipids from globo- and lacto- to ganglio-series upon human embryonic stem cell differentiation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 22564–22569.
39. Boccuto, L., Aoki, K., Flanagan-Steet, H., Chen, C.F., Fan, X., Bartel, F., Petukh, M., Pittman, A., Saul, R., Chaubey, A., Alexov, E., Tiemeyer, M., Steet, R., and Schwartz, C.E. (2014) A mutation in a ganglioside biosynthetic enzyme, ST3GAL5, results in salt & pepper syndrome, a neurocutaneous disorder with altered glycolipid and glycoprotein glycosylation, *Hum. Mol. Genet.*, **23**, 418–433.
40. Lee, D., and Cha, S. (2015) 5-Methoxysalicylic acid matrix for ganglioside analysis with matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **26**, 522–525.
41. Colsch, B., and Woods, A.S. (2010) Localization and imaging of sialylated glycosphingolipids in brain tissue sections by MALDI mass spectrometry, *Glycobiology*, **20**, 661–667.
42. Mank, M., Stahl, B., and Boehm, G. (2004) 2,5-Dihydroxybenzoic acid butylamine and other ionic liquid matrixes for enhanced MALDI-MS analysis of biomolecules, *Anal. Chem.*, **76**, 2938–2950.
43. Sugiura, Y., Shimma, S., Konishi, Y., Yamada, M.K., and Setou, M. (2008) Imaging mass spectrometry technology and application on ganglioside study; visualization of age-dependent accumulation of C20-ganglioside molecular species in the mouse hippocampus, *PLoS One*, **3**, e3232.
44. Chan, K., Lanthier, P., Liu, X., Sandhu, J.K., Stanimirovic, D., and Li, J. (2009) MALDI mass spectrometry imaging of gangliosides in mouse brain using ionic liquid matrix, *Anal. Chim. Acta*, **639**, 57–61.
45. Goto-Inoue, N., Hayasaka, T., Zaima, N., Kashiwagi, Y., Yamamoto, M., Nakamoto, M., and Setou, M. (2010) The detection of glycosphingolipids in brain tissue sections by imaging mass spectrometry using gold nanoparticles, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **21**, 1940–1943.
46. Richards, A.L., Lietz, C.B., Wager-Miller, J., Mackie, K., and Trimpin, S. (2012) Localization and imaging of gangliosides in mouse brain tissue sections by laserspray ionization inlet, *J. Lipid Res.*, **53**, 1390–1398.
47. Whitehead, S.N., Chan, K.H., Gangaraju, S., Slinn, J., Li, J., and Hou, S.T. (2011) Imaging mass spectrometry detection of gangliosides species in the mouse brain following transient focal cerebral ischemia and long-term recovery, *PLoS One*, **6**, e20808.
48. Snel, M.F., and Fuller, M. (2010) High-spatial resolution matrix-assisted laser desorption ionization imaging analysis of glucosylceramide in spleen sections from a mouse model of Gaucher disease, *Anal. Chem.*, **82**, 3664–3670.
49. Ketting, H., Vens-Cappell, S., Soltwisch, J., Pirkel, A., Haier, J., Muthing, J., and Dreisewerd, K. (2014) MALDI mass spectrometry imaging of bioactive lipids in mouse brain with a Synapt G2-S mass spectrometer operated at elevated pressure: improving the analytical sensitivity and the lateral resolution to ten micrometers, *Anal. Chem.*, **86**, 7798–7805.
50. Cheng, S.C., Huang, M.Z., and Shiea, J. (2011) Thin layer chromatography/mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **1218**, 2700–2711.
51. Mlinac, K., Fabris, D., Vukelic, Z., Rozman, M., Heffer, M., and Bogner, S.K. (2013) Structural analysis of brain ganglioside acetylation patterns in mice with altered ganglioside biosynthesis, *Carbohydr. Res.*, **382**, 1–8.
52. Suzuki, A., Miyazaki, M., Matsuda, J., and Yoneshige, A. (2011) High-performance thin-layer chromatography/mass spectrometry for the analysis of neutral glycosphingolipids, *Biochim. Biophys. Acta*, **1811**, 861–874.
53. Miyazaki, M., Yonesige, A., Matsuda, J., Kuroda, Y., Kojima, N., and Suzuki, A. (2008) High-performance thin-layer chromatography/mass spectrometry for rapid analysis of neutral glycosphingolipids, *J. AOAC Int.*, **91**, 1218–1226.
54. Valdes-Gonzalez, T., Goto-Inoue, N., Hirano, W., Ishiyama, H., Hayasaka, T., Setou, M., and Taki, T. (2011) New approach for glyco- and lipidomics-molecular scanning of human brain gangliosides by TLC-Blot and MALDI-QIT-TOF MS, *J. Neurochem.*, **116**, 678–683.
55. Ivleva, V.B., Elkin, Y.N., Budnik, B.A., Moyer, S.C., O'Connor, P.B., and Costello, C.E. (2004) Coupling thin-layer chromatography with vibrational cooling matrix-assisted laser desorption/ionization Fourier transform mass spectrometry for the analysis of ganglioside mixtures, *Anal. Chem.*, **76**, 6484–6491.
56. Ivleva, V.B., Sapp, L.M., O'Connor, P.B., and Costello, C.E. (2005) Ganglioside analysis by thin-layer chromatography matrix-assisted laser desorption/ionization orthogonal time-of-flight mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **16**, 1552–1560.
57. Park, H., Zhou, Y., and Costello, C.E. (2014) Direct analysis of sialylated or sulfated glycosphingolipids and other polar and neutral lipids using TLC-MS interfaces, *J. Lipid Res.*, **55**, 773–781.
58. Sorensen, L.K. (2006) A liquid chromatography/tandem mass spectrometric approach for the determination of gangliosides GD3 and GM3 in bovine milk and infant formulae, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **20**, 3625–3633.
59. Fuller, M., Duplock, S., Hein, L.K., Rigat, B.A., and Mahuran, D.J. (2014) Liquid chromatography/electrospray ionisation-tandem mass spectrometry quantification of GM2 gangliosides in human peripheral cells and plasma, *Anal. Biochem.*, **458**, 20–26.
60. Fong, B., Norris, C., Lowe, E., and McJarrow, P. (2009) Liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry for quantitative analysis of gangliosides, *Lipids*, **44**, 867–874.
61. Lee, H., Lerno, L.A., Jr, Choe, Y., Chu, C.S., Gillies, L.A., Grimm, R., Lebrilla, C.B., and German, J.B. (2012) Multiple precursor ion scanning of gangliosides and sulfatides with a reversed-phase microfluidic chip and quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *Anal. Chem.*, **84**, 5905–5912.

62. Zhang, J., Ren, Y., Huang, B., Tao, B., Pedersen, M.R., and Li, D. (2012) Determination of disialoganglioside GD3 and monosialoganglioside GM3 in infant formulas and whey protein concentrates by ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry, *J. Sep. Sci.*, **35**, 937–946.
63. Steenackers, A., Vanbeselaere, J., Cazet, A., Bobowski, M., Rombouts, Y., Colomb, F., Le Bourhis, X., Guerardel, Y., and Delannoy, P. (2012) Accumulation of unusual gangliosides G(Q3) and G(P3) in breast cancer cells expressing the G(D3) synthase, *Molecules*, **17**, 9559–9572.
64. Nara, K., Watanabe, Y., Kawashima, I., Tai, T., Nagai, Y., and Sanai, Y. (1996) Acceptor substrate specificity of a cloned GD3 synthase that catalyzes the biosynthesis of both GD3 and GD1c/GT1a/GQ1b, *Eur. J. Biochem.*, **238**, 647–652.
65. Nara, K., Watanabe, Y., Maruyama, K., Kasahara, K., Nagai, Y., and Sanai, Y. (1994) Expression cloning of a CMP-NeuAc:NeuAc alpha 2-3Gal beta 1-4Glc beta 1-1'Cer alpha 2,8-sialyltransferase (GD3 synthase) from human melanoma cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 7952–7956.
66. Sasaki, K., Kurata, K., Kojima, N., Kurosawa, N., Ohta, S., Hanai, N., Tsuji, S., and Nishi, T. (1994) Expression cloning of a GM3-specific alpha-2,8-sialyltransferase (GD3 synthase), *J. Biol. Chem.*, **269**, 15950–15956.
67. Furukawa, K., Horie, M., Okutomi, K., Sugano, S., and Furukawa, K. (2003) Isolation and functional analysis of the melanoma specific promoter region of human GD3 synthase gene, *Biochim. Biophys. Acta*, **1627**, 71–78.
68. Yamamoto, A., Haraguchi, M., Yamashiro, S., Fukumoto, S., Furukawa, K., Takamiya, K., Atsuta, M., Shiku, H., and Furukawa, K. (1996) Heterogeneity in the expression pattern of two ganglioside synthase genes during mouse brain development, *J. Neurochem.*, **66**, 26–34.
69. Yu, R.K., Macala, L.J., Taki, T., Weinfield, H.M., and Yu, F.S. (1988) Developmental changes in ganglioside composition and synthesis in embryonic rat brain, *J. Neurochem.*, **50**, 1825–1829.
70. Kang, N.Y., Kim, C.H., Kim, K.S., Ko, J.H., Lee, J.H., Jeong, Y.K., and Lee, Y.C. (2007) Expression of the human CMP-NeuAc:GM3 alpha2,8-sialyltransferase (GD3 synthase) gene through the NF-kappaB activation in human melanoma SK-MEL-2 cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **1769**, 622–630.
71. Dae, H.M., Kwon, H.Y., Kang, N.Y., Song, N.R., Kim, K.S., Kim, C.H., Lee, J.H., and Lee, Y.C. (2009) Isolation and functional analysis of the human glioblastoma-specific promoter region of the human GD3 synthase (hST8Sia I) gene, *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, **41**, 237–245.
72. Marquina, G., Waki, H., Fernandez, L.E., Kon, K., Carr, A., Valiente, O., Perez, R., and Ando, S. (1996) Gangliosides expressed in human breast cancer, *Cancer Res.*, **56**, 5165–5171.
73. Oliva, J.P., Valdes, Z., Casaco, A., Pimentel, G., Gonzalez, J., Alvarez, I., Osorio, M., Velazco, M., Figueroa, M., Ortiz, R., Escobar, X., Orozco, M., Cruz, J., Franco, S., Diaz, M., Roque, L., Carr, A., Vazquez, A.M., Mateos, C., Rubio, M.C., Perez, R., and Fernandez, L.E. (2006) Clinical evidences of GM3 (NeuGc) ganglioside expression in human breast cancer using the 14F7 monoclonal antibody labelled with (99m)Tc, *Breast Cancer Res. Treat.*, **96**, 115–121.
74. Ruckhaberle, E., Rody, A., Engels, K., Gaetje, R., von Minckwitz, G., Schiffmann, S., Grosch, S., Geisslinger, G., Holtrich, U., Karn, T., and Kaufmann, M. (2008) Microarray analysis of altered sphingolipid metabolism reveals prognostic significance of sphingosine kinase 1 in breast cancer, *Breast Cancer Res. Treat.*, **112**, 41–52.
75. Ruckhaberle, E., Karn, T., Rody, A., Hanker, L., Gatje, R., Metzler, D., Holtrich, U., and Kaufmann, M. (2009) Gene expression of ceramide kinase, galactosyl ceramide synthase and ganglioside GD3 synthase is associated with prognosis in breast cancer, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **135**, 1005–1013.
76. Carcel-Trullols, J., Stanley, J.S., Saha, R., Shaaf, S., Bendre, M.S., Monzavi-Karbassi, B., Suva, L.J., and Kieber-Emmons, T. (2006) Characterization of the glycosylation profile of the human breast cancer cell line, MDA-231, and a bone colonizing variant, *Int. J. Oncol.*, **28**, 1173–1183.
77. Gu, Y., Zhang, J., Mi, W., Yang, J., Han, F., Lu, X., and Yu, W. (2008) Silencing of GM3 synthase suppresses lung metastasis of murine breast cancer cells, *Breast Cancer Res.*, **10**, R1.
78. Cazet, A., Groux-Degroote, S., Teylaert, B., Kwon, K.M., Lehoux, S., Slomianny, C., Kim, C.H., Le Bourhis, X., and Delannoy, P. (2009) GD3 synthase overexpression enhances proliferation and migration of MDA-MB-231 breast cancer cells, *Biol. Chem.*, **390**, 601–609.
79. Cazet, A., Lefebvre, J., Adriaenssens, E., Julien, S., Bobowski, M., Grigoriadis, A., Tutt, A., Tulasne, D., Le Bourhis, X., and Delannoy, P. (2010) GD3 synthase expression enhances proliferation and tumor growth of MDA-MB-231 breast cancer cells through c-Met activation, *Mol. Cancer Res.*, **8**, 1526–1535.
80. Cazet, A., Bobowski, M., Rombouts, Y., Lefebvre, J., Steenackers, A., Popa, I., Guerardel, Y., Le Bourhis, X., Tulasne, D., and Delannoy, P. (2012) The ganglioside G(D2) induces the constitutive activation of c-Met in MDA-MB-231 breast cancer cells expressing the G(D3) synthase, *Glycobiology*, **22**, 806–816.
81. Battula, V.L., Shi, Y., Evans, K.W., Wang, R.Y., Spaeth, E.L., Jacamo, R.O., Guerra, R., Sahin, A.A., Marini, F.C., Hortobagyi, G., Mani, S.A., and Andreeff, M. (2012) Ganglioside GD2 identifies breast cancer stem cells and promotes tumorigenesis, *J. Clin. Invest.*, **122**, 2066–2078.
82. Liang, Y.J., Ding, Y., Levery, S.B., Lobaton, M., Handa, K., and Hakomori, S.I. (2013) Differential expression profiles of glycosphingolipids in human breast cancer stem cells vs. cancer non-stem cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 4968–4973.
83. Sarkar, T.R., Battula, V.L., Werden, S.J., Vijay, G.V., Ramirez-Pena, E.Q., Taube, J.H., Chang, J.T., Miura, N., Porter, W., Sphyrin, N., Andreeff, M., and Mani, S.A. (2014) GD3 synthase regulates epithelial-mesenchymal transition and metastasis in breast cancer, *Oncogene*, DOI: 10.1038/onc.2014.245.
84. Taki, T., Hirabayashi, Y., Ishikawa, H., Ando, S., Kon, K., Tanaka, Y., and Matsumoto, M. (1986) A ganglioside of rat ascites hepatoma AH 7974F cells. Occurrence of a novel disialoganglioside (GD1 alpha) with a unique N-acetylneuraminosyl (alpha 2-6)-N-acetylgalactosamine structure, *J. Biol. Chem.*, **261**, 3075–3078.
85. Hirabayashi, Y., Hyogo, A., Nakao, T., Tsuchiya, K., Suzuki, Y., Matsumoto, M., Kon, K., and Ando, S. (1990) Isolation and characterization of extremely minor gangliosides, GM1b and GD1 alpha, in adult bovine brains as developmentally regulated antigens, *J. Biol. Chem.*, **265**, 8144–8151.
86. Furuya, S., Irie, F., Hashikawa, T., Nakazawa, K., Kozakai, A., Hasegawa, A., Sudo, K., and Hirabayashi, Y. (1994) Ganglioside GD1 alpha in cerebellar Purkinje cells. Its specific absence in mouse mutants with Purkinje cell abnormality and altered immunoreactivity in response to conjunctive stimuli causing long-term desensitization, *J. Biol. Chem.*, **269**, 32418–32425.
87. Ikehara, Y., Shimizu, N., Kono, M., Nishihara, S., Nakanishi, H., Kitamura, T., Narimatsu, H., Tsuji, S., and

- Tatematsu, M. (1999) A novel glycosyltransferase with a polyglutamine repeat; a new candidate for GD1alpha synthase (ST6GalNAc V), *FEBS Lett.*, **463**, 92–96.
88. Kroes, R.A., He, H., Emmett, M.R., Nilsson, C.L., Leach, F.E., 3rd, Amster, I.J., Marshall, A.G., and Moskal, J.R. (2010) Overexpression of ST6GalNAcV, a ganglioside-specific alpha2,6-sialyltransferase, inhibits glioma growth *in vivo*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 12646–12651.
89. Taki, T., Ishikawa, D., Ogura, M., Nakajima, M., and Handa, S. (1997) Ganglioside GD1alpha functions in the adhesion of metastatic tumor cells to endothelial cells of the target tissue, *Cancer Res.*, **57**, 1882–1888.
90. Bos, P.D., Zhang, X.H., Nadal, C., Shu, W., Gomis, R.R., Nguyen, D.X., Minn, A.J., van de Vijver, M.J., Gerald, W.L., Foekens, J.A., and Massague, J. (2009) Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain, *Nature*, **459**, 1005–1009.
91. Modak, S., and Cheung, N.K. (2007) Disialoganglioside directed immunotherapy of neuroblastoma, *Cancer Invest.*, **25**, 67–77.
92. Gajdosik, Z. (2014) Racotumomab – a novel anti-idiotypic monoclonal antibody vaccine for the treatment of cancer, *Drugs Today (Barcelona)*, **50**, 301–307.
93. Osorio, M., Gracia, E., Reigosa, E., Hernandez, J., de la Torre, A., Saurez, G., Perez, K., Viada, C., Cepeda, M., Carr, A., Avila, Y., Rodriguez, M., and Fernandez, L.E. (2012) Effect of vaccination with N-glycolyl GM3/VSSP vaccine by subcutaneous injection in patients with advanced cutaneous melanoma, *Cancer Manag. Res.*, **4**, 341–345.
94. Alfonso, S., Valdes-Zayas, A., Santiesteban, E.R., Flores, Y.I., Areces, F., Hernandez, M., Viada, C.E., Mendoza, I.C., Guerra, P.P., Garcia, E., Ortiz, R.A., de la Torre, A.V., Cepeda, M., Perez, K., Chong, E., Hernandez, A.M., Toledo, D., Gonzalez, Z., Mazorra, Z., Crombet, T., Perez, R., Vazquez, A.M., and Macias, A.E. (2014) A randomized, multicenter, placebo-controlled clinical trial of racotumomab-alum vaccine as switch maintenance therapy in advanced non-small cell lung cancer patients, *Clin. Cancer Res.*, **20**, 3660–3671.
95. Kim, Y.J., Choi, J.S., Seo, J., Song, J.Y., Lee, S.E., Kwon, M.J., Kwon, M.J., Kundu, J., Jung, K., Oh, E., Shin, Y.K., and Choi, Y.L. (2014) MET is a potential target for use in combination therapy with EGFR inhibition in triple-negative/basal-like breast cancer, *Int. J. Cancer*, **134**, 2424–2436.
96. Fu, P., Du, F., Yao, M., Lv, K., and Liu, Y. (2014) MicroRNA-185 inhibits proliferation by targeting c-Met in human breast cancer cells, *Exp. Ther. Med.*, **8**, 1879–1883.
97. Dobrenkov, K., and Cheung, N.K. (2014) GD2-targeted immunotherapy and radioimmunotherapy, *Semin. Oncol.*, **41**, 589–612.
98. Chames, P., and Baty, D. (2009) Bispecific antibodies for cancer therapy: the light at the end of the tunnel? *MAbs*, **1**, 539–547.
99. Li, J., Liu, R., Yang, Y., Huang, Y., Li, X., Liu, R., and Shen, X. (2014) Triptolide-induced *in vitro* and *in vivo* cytotoxicity in human breast cancer stem cells and primary breast cancer cells, *Oncol. Rep.*, **31**, 2181–2186.

GANGLIOSIDES IN BREAST CANCER: NEW PERSPECTIVES

S. Groux-Degroote, Y. Guerardel,
S. Julien, P. Delannoy*

*Structural and Functional Glycobiology Unit, UMR CNRS 8576,
University of Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq, France;
E-mail: philippe.delannoy@univ-lille1.fr*

Received January 16, 2015
Revision received April 1, 2015

Gangliosides are essential compounds of the plasma membrane involved in cell adhesion, proliferation, and recognition processes, as well as in the modulation of signal transduction pathways. These functions are mainly supported by the glycan moiety, and changes in the structure of gangliosides occur under pathological conditions including cancers. With progress in mass-spectrometric analysis of gangliosides, the role of gangliosides in breast cancer progression was recently demonstrated. In this review, we summarize current knowledge on the biosynthesis of gangliosides and of the role of disialogangliosides in triple-negative breast cancer progression and metastasis. New perspectives in breast cancer therapy targeting gangliosides are also discussed.

Key words: gangliosides, breast cancer, mass spectrometry, metastasis, c-Met, G_{D3} synthase