

УДК 577.2.616

ПОИСК БЕЛКОВЫХ МАРКЕРОВ ДЛЯ СЫВОРОТОЧНОЙ ДИАГНОСТИКИ ОПУХОЛЕЙ НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ПРОФИЛЕЙ ЭКСПРЕССИИ микроРНК

© 2011 г. Ю. А. Букурова^{1*}, И. Г. Никитина¹, С. Л. Ханкин², Г. С. Краснов¹,
Н. А. Лисицын¹, В. Л. Карпов¹, С. Ф. Берестень^{1*}

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991

²Медицинский центр Банка России, Москва, 117593

Поступила в редакцию 19.05.2010 г.

Принята к печати 21.07.2010 г.

Разработан новый алгоритм биоинформатического поиска потенциальных сывороточных маркеров опухолей, включающий: 1) идентификацию микроРНК, уровень синтеза которых наиболее заметно и часто понижается в опухолях; 2) поиск мРНК-мишеней, регулируемых микроРНК; 3) отбор мишеней, кодирующих секреторные белки; 4) сравнительный анализ уровней транскрипции мишеней в нормальных и опухолевых тканях. Практическое использование алгоритма позволило обнаружить семь потенциальных сывороточных маркеров опухолей толстой кишки: ADAMTS14, ANGPT2, CCL7, DEFA5, MMP11, MMP14 и PLAУ. Экспериментально показано, что уровень синтеза двух из семи белков (MMP14 и DEFA5) в опухолях толстой кишки значительно превышает уровень в нормальной ткани.

Ключевые слова: рак толстой кишки, протеомика, биоинформатика, микроРНК, мРНК-мишень, сывороточные маркеры опухолей.

IDENTIFICATION OF PROTEIN MARKERS FOR SERUM DIAGNOSIS OF CANCER BASED ON microRNA EXPRESSION PROFILING, by Yu. A. Bukurova^{1*}, I. G. Nikitina¹, S. L. Khankin², G. S. Krasnov¹, N. A. Lisitsyn¹, V. L. Karpov¹, S. F. Beresten^{1*} (¹Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia; *e-mail: bukurova@eimb.ru; sberesten@gmail.com; ²Medical Center of the Bank of Russia, Moscow, 117593 Russia). A new algorithm has been developed for bioinformatics search of putative serum markers of cancer, which includes: 1) identification of microRNAs that are most often and most significantly overexpressed in tumors; 2) selection of mRNA targets regulated by microRNAs; 3) identification of mRNA targets encoding secreted proteins; 4) comparative analysis of mRNA transcription levels in normal and tumor tissues. Application of the algorithm led to discovery of seven putative serum markers of colon cancer: ADAMTS14, ANGPT2, CCL7, DEFA5, MMP11, MMP14, and PLAУ. Experiments demonstrated that production of two out of seven proteins (MMP14 and DEFA5) is significantly increased in colon tumors vs. normal samples.

Keywords: colorectal cancer, proteomics, bioinformatics, microRNA, mRNA target, serum protein markers.

Эффективность лечения онкологических больных в значительной степени определяется возможностью ранней диагностики, поэтому на протяжении десятилетий большие усилия были направлены на поиск сывороточных маркеров, специфичных для клеток, находящихся в стадии перехода от доброкачественного к злокачественному состоянию [1]. Для поиска таких маркеров наиболее часто используется сравнительный анализ транскриптомов или протеомов нормальных и опухолевых тканей [2, 3]. Идентификация опу-

холеспецифичных маркеров позволяет получить антитела, которые могут применяться для массового скрининга сывороток крови и других биологических образцов пациентов из групп повышенного риска [4]. Однако многолетние усилия с использованием указанных подходов привели к обнаружению лишь трех маркеров опухолей толстой кишки, которые ограничено используются в клинической практике на поздних стадиях заболевания (раковоэмбриональный антиген, полисахарид СА 19-9 и белок ТИМР-1).

Принятые сокращения: БД – базы данных, микроРНК – miРНК.

* Эл. почта: bukurova@eimb.ru; sberesten@gmail.com

В последнее десятилетие стало очевидным, что эволюция раковых клеток во многом обусловлена потерей контроля клеточного цикла, пролиферации и репарации ДНК, обусловленной дедифференцировкой клеток и их возвратом к “эмбриональному” (плюрипотентному) состоянию. Важную роль в этом процессе играют микроРНК – короткие одноцепочечные РНК, синтез которых начинается на ранних стадиях эмбриогенеза и продолжается в течение всей жизни любого многоклеточного организма [5]. Экспрессия микроРНК (в настоящее время у человека идентифицировано более 800 их видов) приводит к посттранскрипционному ингибированию синтеза продуктов целого ряда генов (в среднем около 300 на одну микроРНК) в результате гибридизации микроРНК и мРНК-мишеней. Понижение уровня транскрипции некоторых микроРНК, часто происходящее в опухолевых клетках, может быть причиной увеличения экспрессии онкогенов. При этом повышение содержания микроРНК, мишенями которых служат гены-супрессоры опухолевого роста, может приводить к снижению их экспрессии в опухолевых клетках [6]. В настоящее время не существует альтернативных подходов к молекулярной диагностике опухолей, приближающихся по специфичности и информативности к методу профилирования экспрессии микроРНК [7].

Нами разработан новый алгоритм биоинформатического поиска сывороточных маркеров опухолей с использованием анализа мишеней тех микроРНК, уровень синтеза которых наиболее заметно и часто понижается в опухолях. Этот алгоритм применен для идентификации потенциальных сывороточных маркеров опухолей толстой кишки.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Биоинформатический поиск. Первый этап поиска потенциальных белковых маркеров опухолей толстой кишки заключался в идентификации микроРНК, уровень синтеза которых наиболее заметно и часто понижается в опухолях толстой кишки, методами биоинформатического поиска. При анализе опубликованных данных [7, 8] и базы данных (БД) Hrtam [9] отбирали микроРНК, уровень синтеза которых понижен в опухолях по данным как минимум двух из трех источников. На втором этапе проводили идентификацию мРНК-мишеней отобранных микроРНК. Критерием отбора в этом случае было совпадение результатов, полученных при использовании не менее двух из четырех алгоритмов поиска мРНК-мишеней, представленных на веб-сервисах TargetScan 5.1 [10, 11], miRBase [12, 13], miRanda [14, 15] и microTar [16, 17]. Третий этап поиска состоял в идентификации мишеней, кодирующих белки, секретируемые в кровотоки или во внеклеточное пространство. При этом использовали один из двух критериев отбора: 1) кодируемый бе-

лок представлен в БД HUPO Plasma Proteome [18, 19] или Sys-BodyFluid [20, 21], содержащих экспериментально подтвержденные данные о секреции белков в кровотоки; 2) кодируемый белок присутствует как минимум в трех из пяти БД, содержащих данные о секреции белков во внеклеточное пространство (eSLDB [22, 23], LOCATE [24, 25], PLOC [26, 27], Wolf PSORT [28, 29] и Babelomics [30, 31]).

Четвертый этап поиска был основан на отборе мРНК, синтез которых наиболее часто усиливается в опухолях толстой кишки по сравнению с нормальными тканями (по результатам БД dbEST [32] и Oncomine [33, 34]). Изменение уровня синтеза мРНК по БД dbEST оценивали с использованием функции I , сбалансировано характеризующей вероятность и степень повышения уровня мРНК в опухоли. С этой целью на первой стадии вычислений определяли величину $R = L_T/L_N$, где L_T и L_N – параметры, отражающие уровень транскрипции мРНК в опухолевых и нормальных тканях соответственно. L_T вычисляли по формуле: $(\bar{E}_T + E_0)^{V_E} (C_T + C_0)^{V_C}$ (значение L_N вычисляли аналогичным образом), где \bar{E}_T – среднее число EST в клонотеках опухолевых тканей толстой кишки; E_0 – среднее число EST на одну мРНК по всем клонотекам нормальных и опухолевых тканей толстой кишки; C_T – доля клонотек опухолевых тканей, в которых присутствует хотя бы одна последовательность EST; C_0 – усредненное значение C_N и C_T для всех мРНК; V_E – степень влияния среднего числа EST на конечный результат (принята равной 1); V_C – степень влияния доли клонотек на результаты анализа (принята равной 0.5).

Конечное значение I определяли следующим образом: $I = R + (R - 1)/S$, если $R \geq 1$, и $I = RS/(S + 1 - R)$, если $R < 1$, где S – функция, отражающая величину стандартного отклонения. Ее значение вычисляли по формуле: $S = \left(\sqrt{(\sigma(E_N)/\bar{E}_N)^2 + (\sigma(E_T)/\bar{E}_T)^2} + \sigma_0 + 1 \right)^{V_\sigma}$, где $\sigma(E)$ – стандартное отклонение количества EST (E) для клонотек нормальных (N) и опухолевых (T) тканей, а σ_0 – относительное стандартное отклонение $(\sigma(E)/\bar{E})$, усредненное по всем мРНК в нормальных и опухолевых клонотеках. Добавочные слагаемые E_0 , C_0 , σ_0 применяли для устранения влияния низкого или нулевого содержания EST, а также низких и нулевых значений относительного стандартного отклонения (при отсутствии EST слагаемым присваивалось нулевое значение). Значение степени влияния V_C , так же как и V_σ , принимали равным 0.5, поскольку соответствующие компоненты в одинаковой степени отражают неравномерность распределения EST по клонотекам. Для дальнейшего анализа отбирали только те мРНК, величина I у которых равна как минимум 5.

Параллельный отбор мРНК, средний уровень которых в опухолях толстой кишки максимально повышен по сравнению с нормой, проводили с использованием данных анализа на микрочипах по БД Oncomine [33, 34]. При этом отбирали мРНК, которые удовлетворяют как минимум одному из двух критериев отбора не менее чем в половине коллекций опухолей толстой кишки Alop [35], Graudens [36], Notterman [37], Kaiser [38], Ki [39] и Sabates-Bellver [40]: 1) значение P для мРНК не превышает пороговое (<0.1) [41]; 2) в опухолях средний уровень транскрипции гена, кодирующего мРНК, превышает уровень его транскрипции в нормальной ткани не менее чем в 3 раза.

На пятом этапе идентифицировали мРНК с низким уровнем синтеза в нормальных тканях. С этой целью отбирали мРНК, уровень которых не превышал определенное пороговое значение не менее чем в 80% нормальных тканей (включая клетки крови) как минимум в двух из трех БД: 1) dbEST [42, 43]; 2) Oncomine [33, 34]; и 3) SAGE [44]. В первом случае за пороговое значение принимали относительный уровень экспрессии (DEU), равный 150. Для коллекций нормальных тканей БД Oncomine (Su [45], Roth [46], Shyamsundar [47], Ge [48], Yanai [49] и Hsiao [50]) за пороговое значение был принят ноль. При этом вычисляли среднее арифметическое величин $\log_2 \text{MCI}$ (т.е. приводимого в БД значения логарифма медианы интенсивности флуоресценции пятна) и отбирали только мРНК с отрицательным средним значением. В качестве порогового значения для БД SAGE принимали количество последовательностей-ярлыков (тэгов), равное 0.5×10^{-4} [44]. На завершающей стадии исключали все ранее обнаруженные белковые маркеры опухолей толстой кишки (по опубликованным данным).

Подготовка образцов. Использовали пять пар образцов первичных опухолей толстой кишки ($T_2N_0M_0$, $T_3N_1M_0$, $T_4N_2M_0$, $T_4N_3M_0$ и $T_4N_1M_1$) и нормальных тканей, удаленных на 10–20 см от опухоли. Образцы, полученные после резекции, максимально быстро замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -70°C . Отсутствие опухолевых клеток в образцах нормальных тканей подтверждали иммуногистохимическим анализом. Ткани гомогенизировали и экстрагировали из них белки, как описано ранее [51].

Вестерн-блот-анализ. Белковые экстракты, содержащие 20 мкг белка в 12.5 мкл, подвергали электрофорезу в градиентном полиакриламидном геле (10–20%) по методу Лэммли [52]. Для количественной оценки полипептидов использовали два белковых стандарта – GAPDH (“R&D Systems”, США) и АСТВ (“NeoMarkers”, США). После разделения белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану Hybond C Extra (“GE Healthcare”), используя mini Trans-Blot transfer cell (“Bio-Rad”) в соответствии с рекомендациями производителя. Мембраны обра-

батывали в течение 2 ч блокирующим буфером (PBS, 1% Tween-20 и 5% обезжиренного сухого молока) и инкубировали с коммерческими антителами к белкам ANGPT2, CCL7, MMP11, MMP14 и PLAУ (“R&D Systems”), ADAMTS14 (“Santa Cruz”) и DEFA5 (“Novus Biologicals”). В случае семейств гомологичных белков использовали антитела, специфичные к отдельным членам семейства.

Антитела разводили согласно рекомендации производителя в 0.4-кратном блокирующем буфере. Мембраны после трехкратной отмывки буфером PBS с 0.01% Tween-20 инкубировали в течение 1 ч с конъюгатами пероксидазы хрена с вторичными антителами кролика к IgG козла (ANGPT2, CCL7, MMP14, PLAУ и ADAMTS14), антителами овцы к IgG кролика (MMP11) или антителами кролика к IgG мыши (DEFA5). Конъюгаты, полученные по стандартной методике ОАО “ВНЦДиЛ”, разводили в 0.4-кратном блокирующем буфере согласно рекомендациям производителя. Мембраны отмывали 3 раза PBS с 0.01% Tween-20 и детектировали сигнал с помощью набора ECL (“GE Healthcare”).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Уникальность разработанного алгоритма поиска маркеров для сывороточной диагностики опухолей состоит во введении дополнительного критерия отбора онкомаркеров – значительного и частого понижения уровня синтеза микроРНК, регулирующих трансляцию мРНК, в процессе канцерогенеза. Основное преимущество такого алгоритма – быстрый и эффективный способ отбора генов, уровень транскрипции которых заметно выше в опухолях, чем в нормальных тканях.

На первом этапе биоинформатического поиска отобрали 10 микроРНК, содержание которых в опухолях толстой кишки ниже, чем в нормальной ткани: hsa-mir-1, -9, -99a, -133a, -137, -186, -202, -218, -335, и -340. Идентификация потенциальных мРНК-мишеней этих микроРНК на втором этапе привела к отбору 2800 мРНК, из которых после третьего этапа остались 139 мРНК, кодирующих белки, секретлируемые в кровотоки или во внеклеточное пространство (рис. 1). На четвертом этапе поиска отобрали 34 мРНК, содержание которых повышено в опухоли, а затем 14 мРНК с низким содержанием в нормальных тканях (включая клетки крови, поскольку использовать маркеры, активно синтезируемые в крови, в сывороточной диагностике опухолей невозможно). Семь мРНК, не описанных ранее как потенциальные маркеры опухолей толстой кишки, кодируют следующие секреторные белки: ADAMTS14 (металлопептидаза, содержащая мотив тромбоспондина первого типа), ANGPT2 (ангиопоэтин 2), CCL7 (лиганд хемокина 7, содержащий C-C-мотив), DEFA5 (α -дефензин 5), MMP11 (металлопептидаза матрикса 11), MMP14 (металлопептидаза матрикса 14, или металлопротеаза мембранного ти-

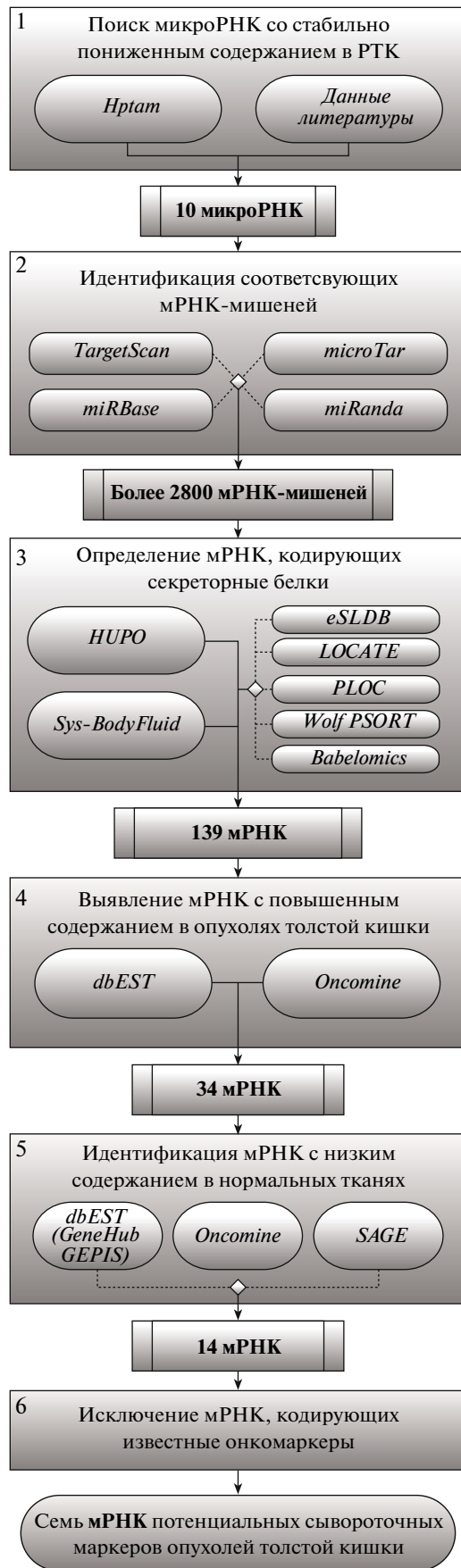


Рис. 1. Схема алгоритма биоинформатического поиска онкомаркеров, секретируемых в кровотоки.

па 1) и PLAU (активатор плазминогена урокиназного типа). Оказалось, что одна из семи мРНК содержится исключительно в нормальном эпителии толстой кишки (*DEFA5*), а другая (*ADAMTS14*) содержится только в опухолях толстой кишки (т.е. ген транскрибируется лишь в ходе эмбрионального развития человека).

Результаты биоинформатического поиска подвергли экспериментальной проверке, основанной на количественном определении методом вестерн-блотинга уровня идентифицированных белковых маркеров в коллекции из пяти пар образцов опухолей толстой кишки и нормальных тканей. Оказалось, что уровень синтеза белков *DEFA5* и *MMP14* в опухолях заметно выше, чем в нормальной ткани (рис. 2). Результаты Вестерн-блот-анализа с использованием антител к белку *DEFA5* соответствовали прилагаемой к антителам информации (по данным компании-поставщика антител белок мигрирует в районе 12 кДа). В то же время, антитела к белку *MMP14* выявили полипептид с молекулярной массой 28 кДа (ожидаемая молекулярная масса 66 кДа), что, по-видимому, указывает на расщепление белка протеазами в тканях толстой кишки, как ранее обнаружили в других тканях [53]. Вестерн-блот-анализ пяти оставшихся потенциальных маркеров РТК показал полное отсутствие сигнала в образцах как нормальных, так и опухолевых тканей, что может быть следствием или низкого уровня синтеза этих белков, или недостаточной аффинности коммерческих антител. Таким образом, экспериментальная проверка показала, что алгоритм способен выявлять новые потенциальные сывороточные маркеры опухолей толстой кишки.

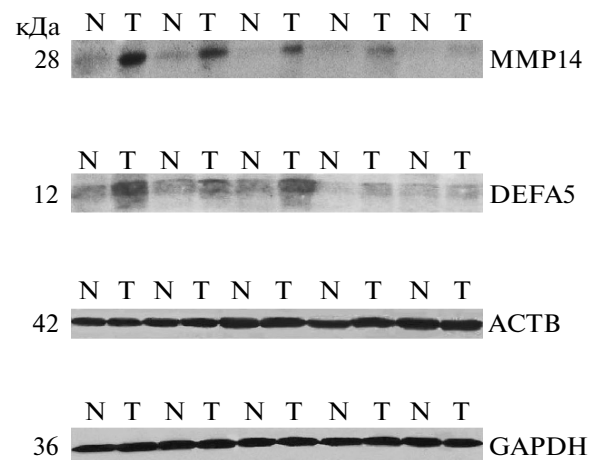


Рис. 2. Вестерн-блот-анализ содержания белков *MMP14* и *DEFA5* в опухолях толстой кишки (Т) и в образцах нормального (N) эпителия.

Опубликованные данные указывают на то, что повышение синтеза α -дефензина 5 и MMP14 в опухолях толстой кишки приводит к ускорению их роста и инвазивности [54, 55]. α -Дефензин 5 — это тканеспецифичный маркер нормального эпителия кишечника человека. Функция этого белка состоит в синтезе бактерицидного катионного пептида, секретируемого клетками Панета [56]. В нормальных тканях α -дефензин 5 секретируется исключительно в просвет кишечника, поэтому в сыворотках крови здоровых доноров он практически не содержится и проникает в кровоток лишь при возникновении опухоли. Это открывает возможность использования α -дефензина 5 для диагностики опухолей толстой кишки в группах повышенного риска.

Функция MMP14 в процессе канцерогенеза состоит в деградации белков внеклеточного матрикса (в частности коллагена) в результате активации каскада протеаз, секретируемых во внеклеточное пространство [57]. Уровень синтеза белка MMP14 регулируется эпидермальным фактором роста через сигнальные пути PI3-K/AKT и MAPK/ERK [58]. Показано, что MMP14 играет важную роль в процессах ангиогенеза [59], а также в регуляции пролиферации клеток [60]. Таким образом, этот белок может оказаться ценным диагностическим маркером опухолей толстой кишки. Анализ информативности маркеров DEFA5 и MMP14 при проведении сывороточной диагностики опухолей толстой кишки потребует дополнительных исследований с использованием высокочувствительных методов иммуноанализа.

Настоящая работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (09-04-13869-офи_ц и 08-04-01807-а) и Международного научно-технического центра (# 3909).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Cunningham D., Atkin W., Lenz H.J., et al. 2010. Colorectal cancer. *Lancet*. **375**, 1030–1047.
- Jellema P., van der Windt D.A., Bruinvels D.J., et al. 2010. Value of symptoms and additional diagnostic tests for colorectal cancer in primary care: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. **340**, c1269.
- Ramaswamy S., Tamayo P., Rifkin R., et al. 2001. Multiclass cancer diagnosis using tumor gene expression signatures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98**, 15149–15154.
- Bitarte N., Bandrés E., Zárate R., et al. 2007. Moving forward in colorectal cancer research, what proteomics has to tell. *World J. Gastroenterol.* **13**, 5813–5821.
- Bartel D.P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. **116**, 281–297.
- Bandyopadhyay S., Mitra R., Maulik U., et al. 2010. Development of the human cancer microRNA network. *Silence*. **1**, 6.
- Lu J., Getz G., Miska E.A., et al. 2005. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. **435**, 834–838.
- Cummins J.M., He Y., Leary R.J., et al. 2006. The colorectal microRNAome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **103**, 3687–3692.
- HPtam Database: Human Potential Tumor Associated miRNA Database, <http://www.hptaa.org/miRNA/index.htm>
- TargetScanHuman 5.1, <http://www.targetscan.org/>
- Friedman R.C., Farh K.K., Burge C.B., et al. 2009. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* **19**, 92–105.
- miRBase, <http://www.mirbase.org/>
- Griffiths-Jones S., Saini H.K., van Dongen S., et al. 2008. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucl. Acids Res.* **36**, D154–158.
- miRanda, <http://www.microrna.org/microrna/home.do>
- John B., Enright A.J., Aravin A., et al. 2004. Human microRNA targets. *PLoS Biol.* **2**, e363.
- microTar, <http://tiger.dbs.nus.edu.sg/microtar/>
- Thadani R., Tammi M.T. 2006. MicroTar: predicting microRNA targets from RNA duplexes. *BMC Bioinformatics*. **7 Suppl 5**, S20.
- HUPO, Human Proteome Organisation, Plasma Proteome Project, <http://www.hupo.org/research/hppp/>
- Cottingham K. 2006. HUPO Plasma Proteome Project: challenges and future directions. *J. Proteome Res.* **5**, 1298.
- Sys-BodyFluid Database, Key Laboratory of Systems Biology, CAS, Shanghai Institutes for Biological Sciences, <http://www.biosino.org/bodyfluid/home.jsp>
- Li S.J., Peng M., Li H., et al. 2009. Sys-BodyFluid: a systematical database for human body fluid proteome research. *Nucl. Acids Res.* **37**, D907–912.
- eSLDB, Eukaryotic Subcellular Localization Database, <http://gpcr.biocomp.unibo.it/esldb/index.htm>
- Pierleoni A., Martelli P.L., Fariselli P., et al. 2007. eSLDB: eukaryotic subcellular localization database. *Nucl. Acids Res.* **35**, D208–212.
- LOCATE, Mammalian Protein Localization Database, <http://locate.imb.uq.edu.au/>
- Sprenger J., Lynn Fink J., Karunaratne S., et al. 2008. LOCATE: a mammalian protein subcellular localization database. *Nucl. Acids Res.* **36**, D230–233.
- PLOC, Protein Localization Prediction, <http://www.genome.jp/SIT/plocdir/>
- Park K.J., Kanehisa M. 2003. Prediction of protein subcellular locations by support vector machines using compositions of amino acids and amino acid pairs. *Bioinformatics*. **19**, 1656–1663.
- WoLF PSORT, Protein Subcellular Localization Prediction, <http://wolfpsort.org/>
- Horton P., Park K.J., Obayashi T., et al. 2007. WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucl. Acids Res.* **35**, W585–587.
- Babelomics, Gene Expression and Functional Profiling Analysis Suite, <http://babelomics.org>
- Al-Shahrour F., Carbonell J., Minguez P., et al. 2008. Babelomics: advanced functional profiling of transcrip-

- tomics, proteomics and genomics experiments. *Nucl. Acids Res.* **36**, W341–346.
32. dbEST, Expressed Sequence Tags Database, National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/>
33. Oncomine, <https://www.oncomine.org/resource/login.html>
34. Rhodes D.R., Yu J., Shanker K., et al. 2004. ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform. *Neoplasia*. **6**, 1–6.
35. Alon U., Barkai N., Notterman D.A., et al. 1999. Broad patterns of gene expression revealed by clustering analysis of tumor and normal colon tissues probed by oligonucleotide arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**, 6745–6750.
36. Graudens E., Boulanger V., Mollard C., et al. 2006. Deciphering cellular states of innate tumor drug responses. *Genome Biol.* **7**, R19.
37. Notterman D.A., Alon U., Sierk A.J., et al. 2001. Transcriptional gene expression profiles of colorectal adenoma, adenocarcinoma, and normal tissue examined by oligonucleotide arrays. *Cancer Res.* **61**, 3124–3130.
38. Kaiser S., Park Y.K., Franklin J., et al. 2007. Transcriptional recapitulation and subversion of embryonic colon development by mouse colon tumor models and human colon cancer. *Genome Biol.* **8**, R131.
39. Ki D.H., Jeung H.C., Park C.H., et al. 2007. Whole genome analysis for liver metastasis gene signatures in colorectal cancer. *Int. J. Cancer*. **121**, 2005–2012.
40. Sabates-Bellver J., van der Flier L.G., de Palo M., et al. 2007. Transcriptome profile of human colorectal adenomas. *Mol. Cancer Res.* **5**, 1263–1275.
41. Shi L., Jones W.D., Jensen R.V., et al. 2008. The balance of reproducibility, sensitivity, and specificity of lists of differentially expressed genes in microarray studies. *BMC Bioinformatics*. **9** (Suppl 9), S10.
42. GeneHub Gepis, <http://www.gepis.org/>
43. Zhang Y., Luoh S.M., Hon L.S., et al. 2007. GeneHub-GEPIS: digital expression profiling for normal and cancer tissues based on an integrated gene database. *Nucl. Acids Res.* **35**, W152–158.
44. SAGE Genie, National Cancer Institute, <http://cgap.nci.nih.gov/SAGE>
45. Su A.I., Cooke M.P., Ching K.A., et al. 2002. Large-scale analysis of the human and mouse transcriptomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **99**, 4465–4470.
46. Roth R.B., Hevezi P., Lee J., et al. 2006. Gene expression analyses reveal molecular relationships among 20 regions of the human CNS. *Neurogenetics*. **7**, 67–80.
47. Shyamsundar R., Kim Y.H., Higgins J.P., et al. 2005. A DNA microarray survey of gene expression in normal human tissues. *Genome Biol.* **6**, R22.
48. Ge X., Yamamoto S., Tsutsumi S., et al. 2005. Interpreting expression profiles of cancers by genome-wide survey of breadth of expression in normal tissues. *Genomics*. **86**, 127–141.
49. Yanai I., Benjamin H., Shmoish M., et al. 2005. Genome-wide midrange transcription profiles reveal expression level relationships in human tissue specification. *Bioinformatics*. **21**, 650–659.
50. Hsiao L.L., Dangond F., Yoshida T., et al. 2001. A compendium of gene expression in normal human tissues. *Physio. Genomics*. **7**, 97–104.
51. Краснов Г.С., Опарина Н.Ю., Ханкин С.Л. и др., 2009. 2-D протеомика рака толстой кишки: идентификация белков с измененным содержанием в опухоли. *Молекуляр. биология*. **43**, 348–356.
52. Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**, 680–685.
53. Wu Y.I., Munshi H.G., Snipas S.J., et al. 2007. Activation-coupled membrane-type 1 matrix metalloproteinase membrane trafficking. *Biochem. J.* **407**, 171–177.
54. Wang X., Wilson M.J., Slaton J.W., et al. 2009. Increased aggressiveness of human prostate PC-3 tumor cells expressing cell surface localized membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *J. Androl.* **30**, 259–274.
55. Basile J.R., Holmbeck K., Bugge T.H., et al. 2007. MT1-MMP controls tumor-induced angiogenesis through the release of semaphorin 4D. *J. Biol. Chem.* **282**, 6899–6905.
56. Salzman N.H., Hung K., Haribhai D., et al. 2010. Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. *Nat. Immunol.* **11**, 76–83.
57. Moss N.M., Barbolina M.V., Liu Y., et al. 2009. Ovarian cancer cell detachment and multicellular aggregate formation are regulated by membrane type 1 matrix metalloproteinase: a potential role in I.p. metastatic dissemination. *Cancer Res.* **69**, 7121–7129.
58. Zhang Z., Song T., Jin Y., et al. 2009. Epidermal growth factor receptor regulates MT1-MMP and MMP-2 synthesis in SiHa cells via both PI3-K/AKT and MAPK/ERK pathways. *Int. J. Gynecol. Cancer*. **19**, 998–1003.
59. Sounni N.E., Dehne K., van Kempen L., et al. 2010. Stromal regulation of vessel stability by MMP14 and TGFbeta. *Dis. Model. Mech.* **3**, 317–332.
60. Maupas-Schwalm F., Bedel A., Auge N., et al. 2009. Integrin alpha 5 beta 3, metalloproteinases, and sphingomyelinase-2 mediate urokinase mitogenic effect. *Cell Signal*. **21**, 1925–1934.