

ТРАНСКРИПЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ РАКОВО-ТЕСТИКУЛЯРНЫХ АНТИГЕНОВ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЛЮМИНАЛЬНЫХ ПОДТИПОВ А И В

Водолажский Д.И., Кутилин Д.С., Могушкова Х.А., Ващенко Л.Н., Никитина В.П., Кит О.И.

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения РФ, Ростов-на-Дону, e-mail: dvodolazhsky@gmail.com

Для идентификации новых молекулярных маркеров рака молочной железы (РМЖ) и эффективных мишеней для иммунотерапии, на основе раково-тестикулярных антигенов (РТА), необходим анализ ассоциации экспрессии генов РТА с клинико-патологическими характеристиками РМЖ, такими как люминальный подтип А/В и возраст пациенток. Методом RT-qPCR выполнен анализ экспрессии 17 генетических локусов (*MAGEA1, MAGEA2, MAGEA3, MAGEA4, MAGEB1, MAGEB2, GAGE1, GAGE3, GAGE4, MAGEC1, BAGE, CTAG1B, XAGE3, NY-ESO1, SSX2, SYCP1 и PRAME1*) в 50 образцах тканей молочной железы. Обнаружено, что транскрипционная активность РТА отличается в разных возрастных группах пациенток (до 55 лет гиперэкспрессия *MAGEA3*, после 55 лет - *MAGEA1, MAGEB1, BAGE, CTAG1B, GAGE1 и GAGE3*) и подтипах РМЖ (в люминальном подтипе А - гиперэкспрессия *MAGEA1, MAGEA2, MAGEA4, MAGEB1, MAGEB2, GAGE3, GAGE4, MAGEC1 и PRAME1*, в люминальном подтипе В не обнаружено генов с повышенной экспрессией). Данные отличия необходимо учитывать при планировании иммунотерапии онкологических заболеваний и использовать в качестве биомаркеров.

Ключевые слова: экспрессия генов, Real-Time qPCR, раково-тестикулярные антигены, рак молочной железы.

TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY OF CANCER-TESTIS ANTIGENS IN PATIENTS WITH BREAST CANCER OF LUMINAL SUBTYPES A AND B

Vodolazhsky D.I., Kutilin D.S., Mogushkova Kh.A., Vashchenko L.N., Nikitina V.P., Kit O.I.

Federal State Institution "Rostov Research Institute of Oncology" of the Ministry of Health of the Russian Federation, Rostov-on-Don, e-mail: dvodolazhsky@gmail.com

To identify new molecular markers of breast cancer and effective targets for immunotherapy, based on cancer-testicular antigens (CTA), an analysis of the association of CTA gene expression with the clinical and pathological characteristics (such as luminal subtype A / B and age of patients) of breast cancer is needed. The expression analysis of 17 genetic loci (*MAGEA1, MAGEA2, MAGEA3, MAGEA4, MAGEB1, MAGEB2, GAGE1, GAGE3, GAGE4, MAGEC1, BAGE, CTAG1B, XAGE3, NY-ESO1, SSX2, SYCP1 and PRAME1*) was performed by RT-qPCR in 50 samples of breast tissue. It was found that the transcriptional activity of CTA differs in different age groups of patients (up to 55 years - overexpression of *MAGEA3*, after 55 years - *MAGEA1, MAGEB1, BAGE, CTAG1B, GAGE1 and GAGE3*) and breast cancer subtypes (in luminal subtype A - overexpression of *MAGEA1, MAGEA2, MAGEA4, MAGEB1, MAGEB2, GAGE3, GAGE4, MAGEC1 and PRAME1*, in luminal subtype B - no one genes with increased expression). These differences should be considered when planning immunotherapy and can be used as biomarkers.

Keywords: gene expression, Real-Time qPCR, cancer-testicular antigens (CTA), breast cancer.

В мире ежегодно регистрируют до 1 млн новых случаев заболевания раком молочной железы (РМЖ) [1]. В Российской Федерации рак молочной железы является самым распространенным злокачественным новообразованием у женщин: в 2013 году было выявлено 57 307 новых случаев заболевания, а число умерших составило более 20 000 пациентов [1].

В настоящее время иммунотерапевтические курсы при РМЖ чаще используются при заболеваниях в продвинутой стадии и в основном направлены на антигены (например MUC1,

СЕА и др.), экспрессирующиеся с повышенной экспрессией в клетках опухолей [2; 3]. Иммуноterapia РМЖ, направленная на раково-тестикулярные антигены (РТА), может быть более эффективной, чем на вышеперечисленные опухолевые антигены. В норме РТА антигены экспрессируются преимущественно в зародышевых клетках человека и в трофобласте, а aberrантно их экспрессия индуцируется в опухолях [4]. Несмотря на то что некоторые соматические ткани (поджелудочная железа, печень и селезенка) экспрессируют мРНК нескольких РТА, уровни мРНК генов РТА составляют, как правило, менее 1% от их экспрессии в семенниках [5].

В рутинной клинической практике выбор лечебных воздействий основан на стандартных прогностических факторах (возраст, наступление менопаузы, размер опухоли, степень её злокачественности, рецепторный статус стероидных гормонов и HER2/neu). Однако стандартные прогностические факторы не всегда способны эффективно предсказать течение и прогноз развития заболевания. Для некоторых раково-тестикулярных антигенов в результате многочисленных исследований было выявлено их прогностическое значение, которое может быть использовано для уточняющей диагностики РМЖ [6,7,8].

В нескольких исследованиях по РМЖ было доказано, что частота экспрессии РТА выше в низкодифференцированных опухолях [7], а в исследовании Grigoriadis A. et al. [9] было обнаружено, что РТА разных классов (СТ-Х, non-Х) по-разному экспрессируются в разных подтипах опухолей молочной железы. Однако исследования генов РТА в основном ограничены семействами MAGE-A и NY-ESO-1. Следовательно, анализ ассоциации экспрессии других генов РТА при РМЖ с клинико-патологическими характеристиками необходим для идентификации новых, возможно более надежных, молекулярных маркеров и мишеней для иммунотерапии.

Целью нашего исследования стал скрининг РТА, специфичных для опухолевых тканей молочной железы люминальных подтипов А и В на основании анализа транскрипционной активности раково-тестикулярных генов.

Материалы и методы

В исследовании использовали парные операционные биоптаты прилегающих не малигнизированных (норма) и опухолевых тканей молочной железы 25 пациенток (50 образцов) в возрасте 38-85 лет, поступивших на лечение в ФГБУ «РНИОИ» МЗ РФ в 2015–2016 гг. Исследование было одобрено этическим комитетом ФГБУ «РНИОИ»; в каждом конкретном случае было получено информированное согласие больного на включение его в данное исследование. Образцы для транспортировки в лабораторию и хранения мгновенно замораживали в жидком азоте без использования крио-/транспортных РНК-сред. Максимальное время от взятия образца до его заморозки в жидком азоте составляло не более

20 с.

Фрагменты ткани измельчали и растирали в фарфоровых ступках в лизирующем растворе, содержащем 4 М гуанидин тиоцианат, 25 мМ цитрат натрия, 0,5% саркозил и 0,1 М 2-меркаптоэтанол. Дальнейшее выделение РНК из тканей проводили по методу Р. Chomczynski и N. Sacchi [10]. Для удаления следов геномной ДНК полученные образцы суммарной РНК обрабатывали препаратами ДНК-азы. Синтез кДНК проводили с использованием коммерческих наборов Reverta-L («Интерлабсервис», Россия). Методом RT-qPCR определяли величины относительной экспрессии 17 генетических локусов: *MAGEA1*, *MAGEA2*, *MAGEA3*, *MAGEA4*, *MAGEB1*, *MAGEB2*, *GAGE1*, *GAGE3*, *GAGE4*, *MAGEC1*, *BAGE*, *CTAG1B*, *XAGE3*, *NY-ESO1*, *SSX2*, *SYCP1* и *PRAME1*. В качестве референсного использовали ген *GAPDH*. Дизайн специфичных олигонуклеотидных праймеров (таблица) осуществлялся нами с использованием референсных последовательностей NCBI GenBank и программы Primer-BLAST.

Полученную библиотеку кДНК амплифицировали в 25 мкл ПЦР-смеси, содержащей 12 нг кДНК, 0,25 мМ dNTPs, 2,5 мМ MgCl₂, 1х-ый ПЦР-буфер и 1 ед. акт. SynTaq ДНК-полимеразы с ингибирующими активностью фермента антителами («Синтол», Россия), краситель EVA-Green и по 400 нМ прямого и обратного праймеров для референсного гена (*GAPDH*) или гена-мишени. Количественную RT-PCR-амплификацию проводили на термоциклере Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad, USA) по следующей программе: первичная денатурация: t=95 °С в течение 3 мин; 40 циклов: t=95 °С в течение 10 с, t=58 °С в течение 30 с (регистрация сигнала), t=72 °С в течение 30 с. Относительную экспрессию генетического локуса (RE) рассчитывали по формуле $RE = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ [11]. Нормализацию проводили по референсному гену *GAPDH* и экспрессии соответствующих генов в образцах нормальной ткани.

Статистический анализ результатов выполняли с использованием пакета прикладных статистических программ Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation, США) и STATISTICA 8.0 (StatSoft Inc., США). Статистическую значимость различий определяли с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Нулевую статистическую гипотезу об отсутствии различий отвергали при p<0,05.

Для проведения статистического анализа были сформированы следующие независимые группы пациенток:

1) группа А (1) - пациентки с возрастом до 55 лет (медиана возраста 45 лет, n=14) и группа Б (2) - пациентки с возрастом старше 55 лет (медиана возраста 68 лет, n=11);

2) группа В (3) - пациентки с гистологически подтвержденным диагнозом РМЖ люминального подтипа А (12 пациенток) и группа Г (4) – пациентки с гистологически

подтвержденным диагнозом РМЖ люминального подтипа В (13 пациенток).

№	Название генетического локуса	Последовательности праймеров 5'→3'	
		Прямой	Обратный
1	<i>MAGEA1</i>	GAAGGAACCTGACCCAGGC	AGGGAATCCTGTCCTCTGGG
2	<i>MAGEA2</i>	CGCAGGCTCCGTGAGG	CTGTGTTGACCTGAGTCACCT
3	<i>MAGEA3</i>	TGAGCAACGAGCGACGG	TCAGCCTGTCCCCTCAGAA
4	<i>MAGEB1</i>	TTCAGTGTGGTGTCCAGCAG	CGAGTTGTA CTCTGGATGATCT
5	<i>MAGEB2</i>	AGCCAGGGGTGAATTCTCAG	GGCACGGAGCTTACTCTTCT
6	<i>GAGE-1</i>	CTGATGGGCAGGAGATGGAC	CCAGTCTGGGCAACATAGTGA
7	<i>GAGE3</i>	TCACACAGATGAGTTGGCGA	CTGTGTGAAATATGAGTTGGCGA
8	<i>GAGE4</i>	GAGGAGGTGAAAACGCCTGA	GCATCATTTCAACGTGCCTTCT
9	<i>MAGEC1</i>	ACGAGGATCGTCTCAGGTCA	CCAGGTCTTCAACTCCTGCT
10	<i>MAGEA4</i>	CTGACCAGCAGCTTGGGAT	TCCAGGGAATCCTGTCCTCC
11	<i>BAGE</i>	GCCGGCTCCTTTCAGGATT	ACATCTTTCAGGAGCTTGGTCA
12	<i>CTAG1B</i>	TCACTGTGTCCGGCAACATA	TGATGGAGAGCTGCAGTTGG
13	<i>XAGE3</i>	ACTTGCCCTGAGACTTAGTTCG	ACTTGCCCTGAGACTTAGTTCG
14	<i>NY-ESO1</i>	GAGTTCACTGTGTCCGGCAA	TGGAGACAGGAGCTGATGGA
15	<i>SSX2</i>	CACGGTTGGTGCTCAAATACC	CCGAGGCTTTCATCTTTTCCC
16	<i>SYCP1</i>	CGGTGAAACCTCAGACCCT	AGTCTTTGCAAATGGAAACTCAAA
17	<i>PRAME1</i>	GCTGAGCCATTGTCTCGTTC	AGGTCTCAGTCACTTGTGGCC
18	<i>GAPDH</i>	GTCAAGGCTGAGAACGGGAA	TCGCCCCACTTGATTTTGGAA

Результаты и обсуждение

В нашем исследовании обнаружено статистически достоверное ($p < 0,05$) увеличение экспрессии генов РТА *MAGEA3*, *MAGEA4* и *GAGE3* в 2,7 (у 63% пациентов); 2,7 (у 42% пациентов) и 2,9 (у 58% пациентов) раза соответственно в опухолевой ткани молочной железы относительно нормальной ткани у пациенток в возрасте 38-85 лет ($n=25$, рис. 1). Данные по гиперэкспрессии генов *MAGEA* при РМЖ подтверждаются в литературных источниках [7,9]. В исследовании Sahin U. и соавторов было показано, что экспрессия РТА отсутствовала в 47% опухолей молочной железы, а в 40% случаев рака молочной железы наблюдалась экспрессия по меньшей мере трёх РТА [12].

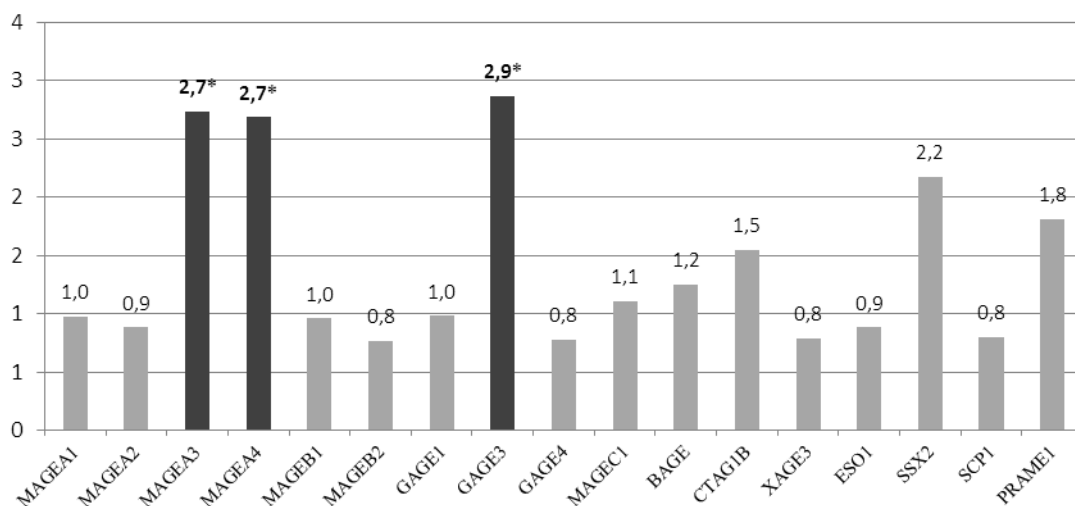


Рис. 1. Соотношение экспрессии генов РТА в опухолевой ткани относительно нормальной у пациенток в возрасте 38-85 лет (n=25)

Интересные результаты были получены при дроблении выборки по возрасту на две группы: группу А - пациентки до 55 лет (медиана возраста 45 лет, n=14) и группу Б - пациентки старше 55 лет (медиана возраста 68 лет, n=11). В группе А наблюдается достоверное увеличение экспрессии гена *MAGEA3* в 2,8 раза ($p < 0,05$, у 64% пациентов), в группе 2 - достоверное ($p < 0,05$) увеличение экспрессии генов *MAGEA1*, *MAGEB1*, *GAGE1*, *GAGE3*, *BAGE* и *CTAG1B* в 6,0 (у 75% пациентов), 3,2 (у 63% пациентов), 4,3 (у 75% пациентов), 9,9 (у 75% пациентов), 1,6 (у 63% пациентов) и в 4,0 (у 75% пациентов) раза соответственно в опухолевой ткани относительно нормальной ткани молочной железы (рис. 2).

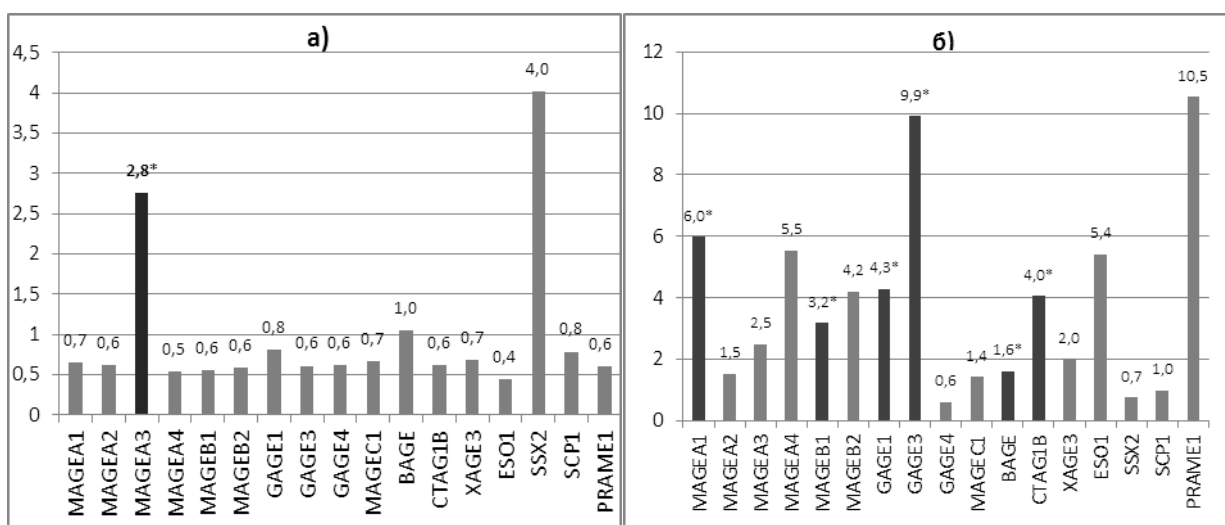


Рис. 2. Соотношение экспрессии генов РТА в опухолевой ткани относительно нормальной у пациенток: а) до 55 лет (медиана возраста 45 лет, n=14), б) старше 55 лет (медиана возраста 68 лет, n=11)

То есть обнаружен дифференциальный профиль экспрессии генетических локусов РТА у пациенток разных возрастных групп, причем до 55 лет обнаружено увеличение только 1 локуса *MAGEA3*, относящегося классу СТ-Х и тестикулярно-селективных РТА, а после 55 лет - 6 локусов (*MAGEA1*, *MAGEB1*, *GAGE1*, *GAGE3*, *BAGE* и *CTAG1B*), относящихся как к классам СТ-Х и non-Х, так и к тестикулярно-селективным и тестикулярно-ограниченным РТА. Наличие возрастных особенностей в профиле экспрессии РТА можно объяснить возрастным изменением гормонального статуса, а также тем, что в исследовании использовались опухоли двух подтипов люминального А и В, экспрессирующие выражено и умеренно рецепторы эстрогена в 90-100% ядер.

Основываясь на данных, представленных в исследованиях Theurillat J.-P. et al. [8], Grigoriadis A. et al. [9], Sugita Y. et al. [13], Namaï A. et al. [14] о связи экспрессии генов некоторых РТА со статусом опухоли по наличию эстрогеновых рецепторов и HER2/neu (например, NY-ESO-1, MAGE-A3 и MAGE-A6), особенно интересно оценить значимую ассоциацию экспрессии более широкого спектра генов РТА с клинико-патологическими характеристиками не РМЖ в целом, а некоторых подгрупп РМЖ, в частности HER2 позитивных и негативных.

Сегодня выделяют две большие группы опухолей молочной железы, происходящие соответственно из базального (миоэпителиального) и люминального эпителия, которые можно отличить друг от друга по экспрессии специфических цитокератинов. Создана молекулярная классификация, согласно которой выделяют варианты РМЖ, различающиеся по прогнозу и чувствительности к различным видам лекарственной терапии. Внутри люминальной подгруппы выделяют два варианта – люминальный А, наиболее прогностически благоприятный, и люминальный В, который примерно в 30% случаев является HER2 позитивным, оставшиеся 70% случаев люминального В РМЖ, имея формальные признаки люминального А варианта (т.е. ER(+)) и/или PgR(+)/HER2/neu(-)), отличаются от него высоким пролиферативным потенциалом и в силу этого характеризуются неблагоприятным прогнозом, мало отличающимся от HER2(-) и тройного негативного вариантов [15].

В нашем исследовании опухоли люминального типа В в 100% случаев экспрессировали HER2/NEU (но в разной степени). Были получены следующие результаты:

1) у пациенток с РМЖ люминального типа А обнаружено статистически достоверное ($p < 0,05$) увеличение экспрессии генов РТА *MAGEA1* в 6,2 раза, *MAGEA2* в 3,5 раза, *MAGEA4* в 14,9 раза, *MAGEB1* в 15,0 раза, *MAGEB2* в 4,1 раза, *GAGE3* в 36,2 раза, *GAGE4* в 8,5 раз, *MAGEC1* в 9,7 раза и *PRAME1* в 30,4 раза в опухолевой ткани относительно нормальной ткани (рис. 3а);

2) у пациенток с РМЖ люминального типа В обнаружено статистически достоверное ($p < 0,05$) снижение экспрессии генов РТА *MAGEB2* и *GAGE4* в 8,0 и 3,0 раза соответственно в опухолевой ткани относительно нормальной ткани. Достоверного изменения экспрессии других РТА генов не обнаружено (рис. 3б).

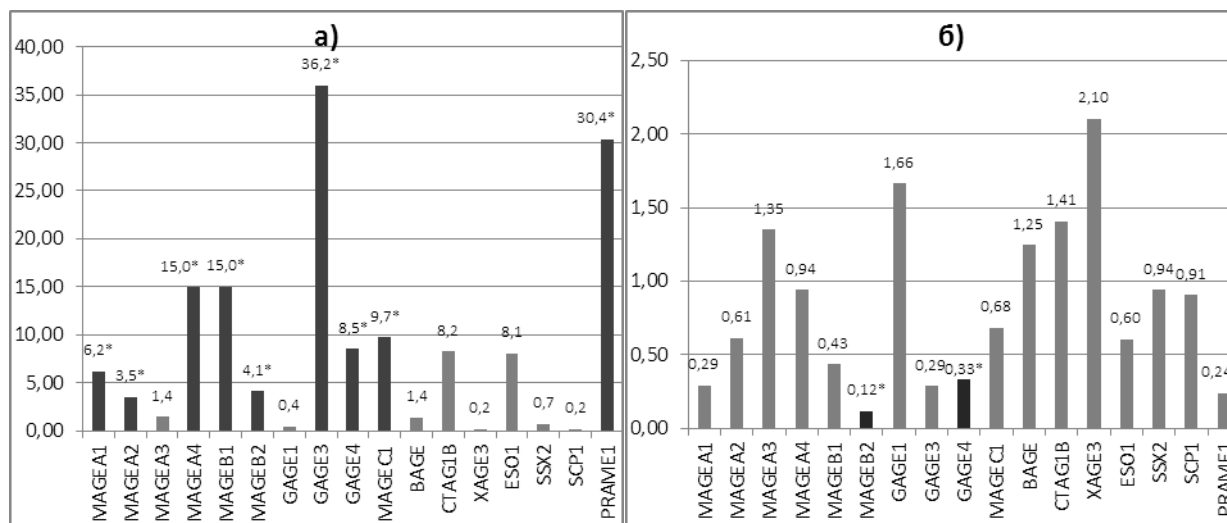


Рис. 3. Соотношение экспрессии генов РТА в опухолевой ткани относительно нормальной у пациенток РМЖ: а) люминального типа А (n=12), б) люминального типа В (n=13)

Полученные нами закономерности в изменении транскрипционной активности РТА-локусов двух групп пациенток с люминальным А и люминальным В подтипом РМЖ хорошо согласуются с прогнозом развития заболевания. В отличие от опухолей люминального подтипа А у опухолей люминального подтипа В не наблюдалось существенного увеличения транскрипционной активности исследованных РТА-локусов, что свидетельствует об их низком иммунотерапевтическом потенциале при лечении РМЖ данного типа. А достоверное снижение экспрессии генов *MAGEB2* и *GAGE4* может служить диагностическим маркером РМЖ люминального типа В, так же как и увеличение экспрессии 9 локусов при РМЖ люминального типа А.

Заключение

Обнаруженное увеличение экспрессии генов *MAGEA1*, *MAGEA2*, *MAGEA3*, *MAGEA4*, *MAGEB1*, *MAGEB2*, *BAGE*, *CTAG1B*, *GAGE1*, *MAGEC1*, *PRAME1*, *GAGE4* и *GAGE3* создает предпосылки для использования этих РТА в качестве наиболее эффективных мишеней иммунотерапии РМЖ. Но для разных возрастных групп пациенток в качестве такой мишени выступают разные группы РТА: для пациенток до 55 лет - *MAGEA3*, для пациенток старше 55 лет - *MAGEA1*, *MAGEB1*, *BAGE*, *CTAG1B*, *GAGE1* и *GAGE3*, так же как и для люминального типа А (*MAGEA1*, *MAGEA2*, *MAGEA4*, *MAGEB1*, *MAGEB2*, *GAGE3*, *GAGE4*, *MAGEC1* и *PRAME1*) и В (локусов с повышенной экспрессией не обнаружено). Данные

отличия транскрипционного профиля генов РТА, ассоциированные с возрастом и люминальным А/В типом РМЖ, необходимо учитывать при планировании и проведении иммунотерапии.

Обобщая приведенные выше результаты, можно сделать вывод, что гены РТА являются также перспективными биомаркерами прогрессии заболевания как для РМЖ в целом (*MAGEA3*, *MAGEA4* и *GAGE3*), так и для его отдельных подтипов в частности.

Список литературы

1. Пак Д.Д. Современные подходы к лечению больных с карциномой *in situ* молочной железы / Д.Д. Пак, Ф.Н. Усов, Е.Ю. Фетисова, А.А. Волченко, В.В. Ефанов // Онкология. Журнал им. П.А. Герцена. – 2013. – № 4. – С. 34-39.
2. Водолажский Д.И. Механизмы регуляции экспрессии раковых тестикулярных антигенов / Д.И. Водолажский, О.И. Кит, Х.А. Могушкова, А.А. Пушкин, И.В. Межевова, Н.Н. Тимошкина // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 5.; URL: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=25345>.
3. Curigliano G., Locatelli M., Fumagalli L., Goldhirsch A. Immunizing against breast cancer: a new swing for an old sword // *Breast*. – 2009. – 18 Suppl 3. – P. 951-954.
4. Скородумова Л.О. Исследование экспрессии раково-тестикулярных генов в образцах рака молочной железы / Л.О. Скородумова, М.И. Лукашина, Л.Е. Сальникова, О.А. Тихонова, С.Ю. Иванов, С.С. Ларин // Доклады Академии наук. – 2013. – № 6 (453). – С. 694-696.
5. Caballero O.L., Chen Y.T. Cancer/testis (CT) antigens: potential targets for immunotherapy // *Cancer Sci*. – 2009. – V. 100. – P. 2014-2021.
6. Kavalari R., Sarcevic B., Spagnoli G.C. et al. Expression of MAGE tumour-associated antigens is inversely correlated with tumour differentiation in invasive ductal breast cancers: an immunohistochemical study // *Virchows Arch*. – 2001. – 439. – № 2. – P. 127-131.
7. Matkovic B., Juretic A., Spagnoli G.C. et al. Expression of MAGE-A and NY-ESO-1 cancer/testis antigens in medullary breast cancer: retrospective immunohistochemical study // *Croat Med J*. – 2011. – 52. – № 2. – P. 171-177.
8. Theurillat J.P., Ingold F., Frei C. et al. NY-ESO-1 protein expression in primary breast carcinoma and metastases: correlation with CD8+ T-cell and CD79a+ plasmacytic/B-cell infiltration // *Int J Cancer*. – 2007. – 120. – № 11. – P. 2411-2417.
9. Grigoriadis A., Caballero O.L., Hoek K.S. et al. CT-X antigen expression in human breast cancer // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. – 2009. – 106. – № 32. – P. 13493-13498.

10. Chomczynski P., Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on // Nature Protocols. - 2006. - 2. - P. 581-585.
11. Schmittgen T.D., Livak K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. Nature Protocols. – 2008. – №3. – P. 1101-1108.
12. Sahin U., Tureci O., Chen Y.T. et al. Expression of multiple cancer/testis (CT) antigens in breast cancer and melanoma: basis for polyvalent CT vaccine strategies // Int. J. Cancer. - 1998. - V. 78. - P. 387-389.
13. Sugita Y., Wada H., Fujita S. et al. NY-ESO-1 expression and immunogenicity in malignant and benign breast tumors // Cancer research. – 2004. – 64. – № 6. – P. 2199-204.
14. Hamai A., Duperrier-Amouriaux K., Pignon P. et al. Antibody responses to NY-ESO-1 in primary breast cancer identify a subtype target for immunotherapy // PLoS One. – 2011. – 6. – № 6. – P. e21129.
15. Стенина М.Б., Фролова М.А. Рак молочной железы: наиболее важные научные события и выводы последних лет // Практическая онкология. - 2011. - Т. 12, № 1. - С. 6-11.