

UDC 577.29:577.27

Особливості експресії генів пухлиноасоційованих антигенів медулярної карциноми молочної залози у різних типах пухлин молочної залози

М. А. Шиян^{1,2}, О. І. Костянець^{1,2}, О. Ю. Цуварєв¹, А. В. Столярук¹,
С. В. Антонюк³, В. В. Філоненко¹, Р. Г. Кіямова¹

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, Україна, 03680

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Вул. Володимирська, 64, Київ, Україна, 01601

³Дніпропетровський клінічний онкологічний центр
Вул. Космічна, 21, Дніпропетровськ, Україна, 49100

m.a.shyyan@gmail.com

Мета. Дослідити особливості експресії генів дев'яти пухлиноасоційованих антигенів медулярної карциноми молочної залози (МКМЗ) у пухлинах молочної залози різних гістологічних типів і проаналізувати можливість існування кореляції між змінами в рівні експресії генів та наявністю імунної відповіді проти відповідних антигенів. **Методи.** Полімеразна ланцюгової реакції у режимі реального часу. **Результати.** Виявлено диференційний профіль експресії шести (RAD50, HMGN2, RBPJ, PABPC4, BRAP і DEK) з дев'яти досліджуваних генів у різних гістологічних типах пухлин молочної залози. Кореляції між змінами в рівні експресії генів та наявністю імунної відповіді проти відповідних антигенів не встановлено. **Висновки.** Гени RAD50, HMGN2, RBPJ, PABPC4, BRAP і DEK антигенів МКМЗ, які мають диференційний профіль експресії у різних гістологічних типах пухлин молочної залози, є потенційними діагностичними маркерами раку молочної залози. Встановлено, що зміна експресії досліджених генів не є обов'язковою умовою виникнення імунної відповіді проти їхніх білкових продуктів.

Ключові слова: карцинома молочної залози, пухлиноасоційовані антигени, імунореактивність.

Вступ. Рак молочної залози – це найпоширеніший тип раку серед жінок з високим рівнем смертності, який представлений здебільшого пухлинами епітеліального походження – карциномами молочної залози (КМЗ). Серед цих пухлин за гістопатологічними ознаками виділяють три найрозповсюдженіших типи: інвазивні карциноми протоків (ІКП, 50–80 % від усіх КМЗ), дольок (ІКД, 5–15 %) та медулярні карциноми (МК, 1–7 %) [1]. Така гетерогенність злякисних пухлин молочної залози свідчить про необхідність пошуку нових маркерів для диференційної діагностики і терапії цього захворювання.

Відомо, що в процесі онкогенезу структурно змінені, ампліфіковані чи аберантно експресовані білки (пухлиноасоційовані антигени – ПАА) іноді можуть розпізнаватися імунною системою людини як чужорідні та спричиняти клітинну і гуморальну імунну відповідь [2]. Вивчення причин імуногенності даних білків, а також виявлення специфічних або диференційних профілів експресії генів ПАА у різних гістологічних типах КМЗ можуть стати основою розробки нових, значно ефективніших підходів і засобів для діагностування і терапії раку молочної залози. Крім того, це розширить існуючі уявлення про молекулярні механізми злякисного переродження і протипухлинної імунної відповіді [1].

Застосування сучасних високоефективних технологій, зокрема, фагового дисплея, SEREX (serological identification of antigens by recombinant expression cloning), SERPA (serological proteome analysis) та білкових мікрочипів, а також мета-аналізу баз даних і літературних джерел дозволило ідентифікувати цілу низку потенційних пухлиноасоційованих антигенів [3]. У попередніх дослідженнях за допомогою модифікованого методу SEREX нами також визначено пухлиноасоційовані антигени МКМЗ [4]. Однак подальше їхнє використання як можливих діагностичних біомаркерів неопластичних захворювань і мішеней для направленої терапії пухлин потребує детальнішої характеристики, зокрема, вивчення особливостей експресії в різних типах карцином молочної залози та імуногенності у онокохворих, оскільки на сьогодні остаточно не з'ясовано, чому деякі аутологічні білки в процесі пухлинного розвитку стають аутоантигенами. Більшість авторів зазначає, що гуморальна імунна відповідь найчастіше формується на білки зі зміненою концентрацією, а частка білків з набутими в результаті мутацій антигенними властивостями порівняно мала [2, 5]. Дане питання залишається не до кінця вивченим і потребує додаткових досліджень.

Мета цієї роботи полягала, по-перше, у вивченні особливостей експресії генів дев'яти пухлиноасоційованих антигенів у пухлинах молочної залози різних гістологічних типів порівняно з умовно нормальними тканинами пацієнтів з фіброзно-кістозною хворобою, використовуючи метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у режимі реального часу і, по-друге, у визначенні можливості існування зв'язку між змінами в рівні експресії генів та індукцією гуморальної імунної відповіді проти їхніх білкових продуктів.

Матеріали і методи. Зразки тканин і сироваток крові пацієнтів. Хірургічний матеріал зразків нормальних тканин і пухлин молочної залози отримано впродовж 2009–2011 рр. у Дніпропетровському клінічному онкологічному центрі (Україна). Відразу після хірургічного видалення пухлини заморожували в рідкому азоті і зберігали до використання за температури -70°C . Для дослідів взято 35 зразків карцином молочної залози: інвазивну карциному протоків ($n = 22$), інвазивну карциному дольок ($n = 8$)

та медулярну карциному ($n = 5$). Як контроль використано тканини молочної залози (МЗ) пацієнтів з фіброзно-кістозною хворобою (ФКХ) ($n = 5$) (табл. 1).

Гістологічний тип і ступінь злоякісності пухлин МЗ встановлено на основі гістологічного та імуногістохімічного аналізу (Дніпропетровський клінічний онкологічний центр).

В експериментах використано сироватки онкохворих і здорових донорів, надані Дніпропетровським клінічним онкологічним центром (табл. 1). Зразки сироваток отримували стандартною флеботомією без використання антикоагулянта і зберігали за температури -20°C з додаванням гліцеролу до 50 %.

Протокол даного дослідження схвалено Етичними комітетами Інституту молекулярної біології і генетики НАН України і Дніпропетровського клінічного онкологічного центру.

ПЛР у режимі реального часу. Виділення тотальної РНК, обробка ДНКазою I і синтез кДНК. Сумарну РНК із зразків пухлин і нормальних тканин МЗ виділяли гуанідин-тіоціанат-хлороформним методом за стандартним протоколом [6]. Кількість і чистоту виділеної загальної РНК визначали за допомогою спектрофотометра Biomat 5 («Thermo Electron», США) та 1 % формальдегід-агарозного денатурувального гель-електрофорезу.

Аліквоти тотальної РНК (3 мкг), виділеної із зразків тканин, обробляли ДНКазою I відповідно до протоколу виробника («Fermentas», США). Для синтезу кДНК використано зворотну транскриптазу RevertAid Reverse Transcriptase Kit і олігонуклеотидні праймери Оліго(дТ)₁₈ відповідно до стандартних протоколів виробника («Fermentas»).

Полімеразну ланцюгову реакцію у режимі реального часу проводили в ампліфікаторі iCycler iQ5 («Bio-Rad», США) з використанням набору реагентів SYBR Green I Master Mix $\times 2$ («Fermentas»). Ампліфікацію здійснювали за таких температурних умов: 95°C для початкової денатурації (60 с) та 45 двостадійних циклів ампліфікації – денатурація при 95°C (10 с) та гібридизація специфічних праймерів і їхня елонгація при 60°C (60 с).

Однорідність і специфічність продуктів ПЛР аналізували електрофорезом в 1 %-му агарозному гелі, а також за наявністю гострого піка на кривих плавлення продуктів реакції.

Таблиця 1
Характеристика зразків тканин і сироваток крові пацієнтів та осіб контрольної групи

Характеристика	Кількість зразків	
	Тканина	Сироватка крові
<i>Дослідна група (для зразків тканин: 35 пацієнтів, середній вік (роки) \pm СВ 59,22 \pm 12,7, віковий діапазон 35–82; для зразків сироватки: 132 пацієнти, середній вік (роки) \pm СВ 51,49 \pm 17,2, віковий діапазон 19–82)</i>		
Інвазивна карцинома протоків	22	80
Інвазивна карцинома дольок	8	23
Медулярна карцинома	5	9
Фібroadенома	–	20
Із них пухлини з відомим ступенем злоякісності, % від загального:	86	82
1-й ступінь	0	7,3
2-й ступінь	22,2	33,9
3-й ступінь	77,8	59,8
Із них зі статусом ER, %	76	52
Позитивні	78,1	71,1
Негативні	21,9	28,9
Із них зі статусом PR, %	76	52
Позитивні	62,5	61,5
Негативні	37,5	38,5
Із них зі статусом HER-2/neu, %	76	52
Позитивні	31,3	30,8
Негативні	68,7	69,2
Із них зі статусом Ki-67, %	43	–
Із них зі статусом лімфатичних вузлів, % позитивних	20	28,8
<i>Контрольна група (для зразків тканин: п'ять пацієнтів з ФКХ, середній вік (роки) \pm СВ 49,2 \pm 10,04, віковий діапазон 36–70; для зразків сироватки: 35 здорових донорів, середній вік (роки) \pm СВ 39,2 \pm 12,56, віковий діапазон 17–60)</i>		

Примітка. СВ – стандартне відхилення; ER – естрогенний рецептор; PR – прогестероновий рецептор; ФКХ – фіброзно-кістозна хвороба.

Розрахунок відносної експресії цільових генів відносно ендогенного контролю і порівняння їх між різними зразками проводили з використанням методу LinReg-Ct ПЛР і рівняння Пфаффа [7]:

$$\text{Відносний рівень експресії гена} = \frac{(E_{\text{ЦГ}})^{\Delta Ct_{\text{ЦГ}}(\text{контроль-пухлина})}}{(E_{\text{РГ}})^{\Delta Ct_{\text{РГ}}(\text{контроль-пухлина})}}$$

де $E_{\text{ЦГ}}$ і $E_{\text{РГ}}$ — ефективність ПЛР для цільового і референтного гена відповідно; $\Delta Ct_{\text{ЦГ}}$ — різниця значень Ct , отриманих для цільового гена між зразка-

ми контролю і пухлини; $\Delta Ct_{\text{РГ}}$ — різниця значень Ct , отриманих для референтного гена між зразками контролю і пухлини. Як контроль використано середнє значення експресії відповідних генів у п'яти зразках тканин МЗ пацієнтів, хворих на ФКХ.

Імуноферментний аналіз. Імуноферментний аналіз кількості антитіл проти антигенів медулярної карциноми молочної залози у сироватках пацієнтів з КМЗ та здорових донорів проводили за стандартним протоколом [8]. Антигенами слугували їхні рекомбінантні аналоги, отримані в наших попередніх дослідженнях [8].

Таблиця 2
Характеристика дев'яти цільових антигенів

Антиген	Функція	Властивості
RAD50	Репарація дволанцюгових розривів ДНК [12]	SEREX-антигени медулярної карциноми МЗ [10]
FAM50A	Невідома. Участь у клітинному циклі	
HMG2	Ремоделювання хроматину	
RBPJ	Міжклітинна комунікація сигнального шляху Notch	
PAVPC4	Регуляція трансляції і стабільності мРНК	
CTSL1	Внутрішньо- і позаклітинний протеоліз	
DEK	Реплікація і репарація ДНК, сплайсинг мРНК [13, 14]	
BRAP	Ядерний імпорт білків [15]	Антиген, що зустрічається найчастіше у базі даних SEREX-антигенів
NaPi2b	Транспорт неорганічного фосфату у клітину [16]	Маркер РМЗ [17]

Статистична обробка даних. Експресію цільового гена у зразку пухлинної тканини вважали зміненою – підвищеною чи, навпаки, зниженою, якщо вона була відповідно втричі вищою або нижчою [3, 9] за середнє значення відносного рівня експресії відповідного гена для контрольної групи умовно нормальних тканин МЗ пацієнтів із ФКХ за даними ПЛР-аналізу [3, 9]. Достовірну різницю між частотами виявлення випадків зі зміненою експресією генів у пухлинах МЗ порівняно з умовно нормальними тканинами визначали з використанням критерію Пірсона (χ_2).

Зразки сироваток вважали позитивними, якщо показник їхньої оптичної густини в імуноферментному аналізі [8] перевищував порогове значення (cut-off), розраховане як середнє значення контрольних сироваток здорових донорів із додаванням трьох стандартних відхилень.

Біоінформатичний аналіз. Для біоінформатичного аналізу SEREX-антигенів використовували ба-

зу даних SEREX-антигенів CID (Cancer Immunome Database, URL: <http://ludwig-sun5.unil.ch/CancerImmunomeDB/>).

Частоти виявлення антигенів у бібліотеках кДНК бази даних CID визначали за допомогою програми Excel (Microsoft Office, 2007).

Результати і обговорення. *Панель з дев'яти цільових антигенів, відібраних для аналізу.* Для дослідження профілю експресії у пухлинах МЗ різних гістологічних типів порівняно з нормальними тканинами молочної залози відібрано дев'ять цільових антигенів. Панель з дев'ятьма цільовими антигенами (П9ЦА) містила сім потенційних ПАА медулярної КМЗ (RAD50, FAM50A, HMG2, RBPJ, PAVPC4, CTSL1, DEK), обраних за результатами фагового алогенного скринінгу 41 аутоантигену медулярної КМЗ [10] як такі, що реагували винятково з сироватками крові пацієнтів, хворих на карциному МЗ [11]. Білки BRAP і NaPi2B залучено до аналізу з огляду на те, що підвищену експресію їхніх генів знайдено в різних пухлинах, у тому числі і пухлинах МЗ (табл. 2).

Варто відмітити, що антиген NaPi2B є мішенню для терапевтичних моноклональних антитіл MX35, які проходять клінічні випробування при лікуванні раку яєчника [16–19]. Виявлення нових сайтів експресії NaPi2B у пухлинах розширює можливості застосування антитіл MX35 для терапії пацієнтів з іншими типами раку, зокрема, раку молочної залози.

Визначення відносного рівня експресії генів цільових антигенів на рівні мРНК у різних типах карцином молочної залози із застосуванням ПЛР у режимі реального часу. Для визначення профілю експресії генів П9ЦА у різних типах пухлин МЗ та в непухлинних тканинах ми застосували ПЛР у режимі реального часу.

У табл. 3 представлено результати ПЛР-аналізу, а саме – кількість зразків КМЗ та тканин пацієнтів з ФКХ зі зміненою експресією генів. Варто зазначити, що рівні експресії усіх дев'яти цільових антигенів у зразках тканин пацієнтів з фіброзно-кістозними хворобами не виходили за межі встановленого порогу, за винятком одного випадку зменшення рівня експресії гена *SLC34A2* (табл. 3).

На основі проведених досліджень виявлено достовірну різницю між рівнями експресії трьох генів

Таблиця 3

Аналіз експресії дев'яти цільових генів у карциномах молочної залози (КМЗ) та тканинах пацієнтів з фіброзно-кістозними хворобами (ФКХ)

Ген	Кількість зразків тканин зі змінним рівнем експресії мРНК		
	КМЗ (n = 35)		ФКХ (n = 5)
	Підвищений	Знижений	Підвищений або знижений
<i>RAD50</i>	2	19*	0
<i>FAM50A</i>	16	6	0
<i>RBPJ</i>	15	1	0
<i>PABPC4</i>	6	12	0
<i>HMG2</i>	4	10	0
<i>CTSL1</i>	4	7	0
<i>DEK</i>	21*	2	0
<i>BRAP</i>	1	24**	0
<i>SLC34A2</i>	11	2	Один знижений

Примітка. *p < 0,05; **p < 0,01.

Таблиця 4

Профіль експресії генів П9ЦА в карциномах молочної залози різних гістологічних типів

Ген	Кількість зразків КМЗ зі змінним рівнем експресії генів					
	ІКП (n = 22)		ІКД (n = 8)		МК (n = 5)	
	Підвищений	Знижений	Підвищений	Знижений	Підвищений	Знижений
<i>RAD50</i>	1	8	1	7*	0	5*
<i>FAM50A</i>	10	4	1	0	2	1
<i>RBPJ</i>	13*	1	0	0	0	0
<i>PABPC4</i>	6	6	0	7*	0	0
<i>HMG2</i>	4	3	0	5*	0	1
<i>CTSL1</i>	3	6	0	1	0	0
<i>DEK</i>	14*	1	3	1	5*	0
<i>BRAP</i>	1	16**	0	5*	0	2
<i>SLC34A2</i>	8	2	1	0	1	0

Примітка. ІКП – Інвазивна карцинома протоків; ІКД – інвазивна карцинома дольок; МК – медулярна карцинома молочної залози; *p < 0,05; **p < 0,01.

(*RAD50*, *DEK*, *BRAP*) при КМЗ порівняно з тканинами МЗ пацієнтів з ФКХ. Встановлено, що експресія гена *DEK* втричі вища, а генів *RAD50* і *BRAP* – утричі нижча при КМЗ порівняно з контрольною тканиною. Це узгоджується з даними літератури, згідно з

якими зазначені гени прямо чи опосередковано залучені до розвитку пухлинних захворювань.

Ми також провели аналіз експресії генів П9ЦА з урахуванням гістологічних типів карциноми молочної залози (табл. 4 і рис. 1).

Порівняльний аналіз експресії досліджуваних генів у КМЗ різних гістологічних типів та в тканинах пацієнтів з ФКХ дозволив виявити деякі групові відмінності (табл. 4). Так, встановлено достовірне зростання рівнів експресії генів *DEK* і *RBPJ*, а також зменшення рівня експресії гена *BRAP* при інвазивній карциномі протоків порівняно з нормою. Достовірне падіння рівня експресії чотирьох генів (*RAD50*, *HMG2*, *PABPC4* і *BRAP*) відносно норми зафіксовано у пацієнтів з ІКД, при цьому достовірне зниження рівня експресії генів *HMG2* і *PABPC4* виявлено лише в даному типі карцином МЗ. У медулярній КМЗ зареєстровано достовірне підвищення рівня експресії гена *DEK* та зниження рівня експресії гена *RAD50* порівняно з нормою.

Таким чином, ми виявили диференційний профіль експресії шести з дев'яти досліджених генів (*RAD50*, *HMG2*, *RBPJ*, *PABPC4*, *BRAP* і *DEK*) у різних гістологічних типах КМЗ за допомогою кількісного ПЛР-аналізу (рис. 2).

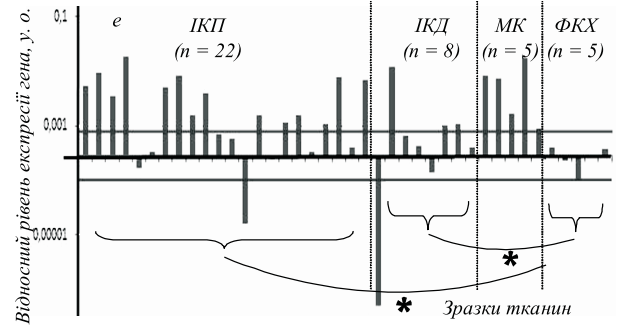
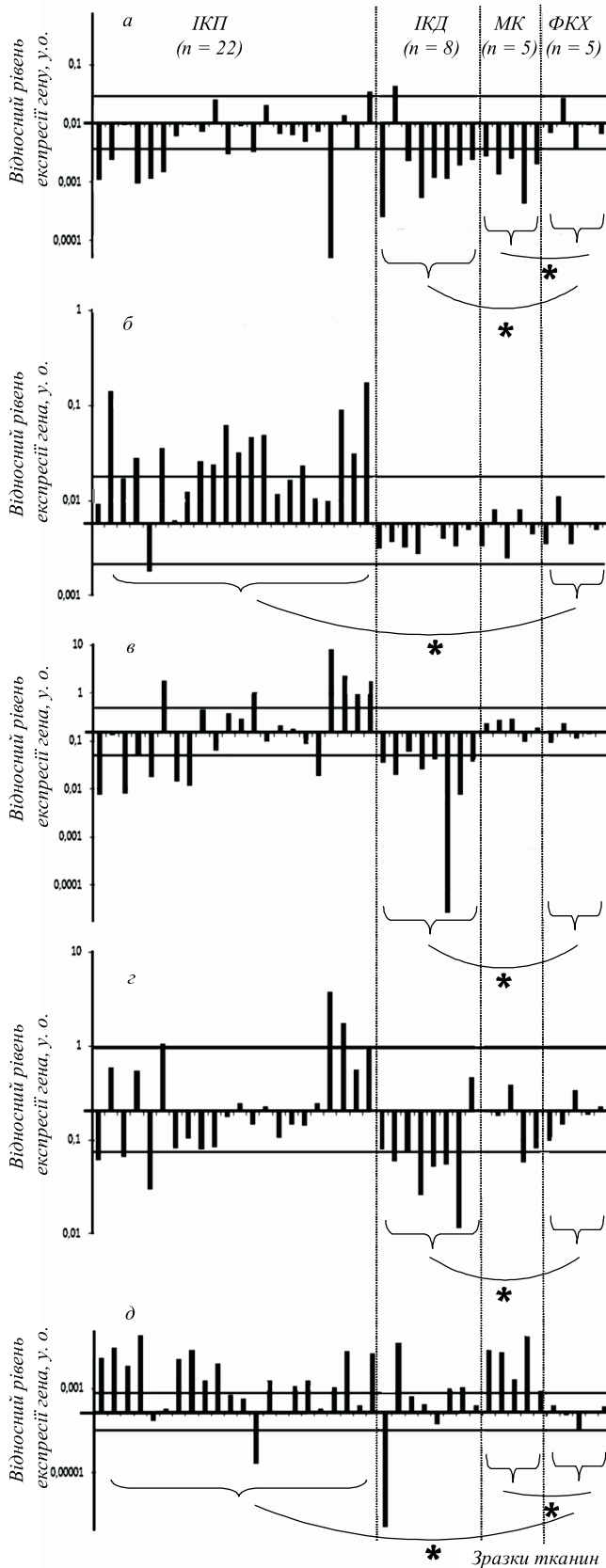


Рис. 1. Аналіз експресії цільових генів *RAD50* (а), *RBPJ* (б), *PABPC4* (в), *HMGN2* (г) і *BRAP* (е) у зразках пухлин різних гістологічних типів та контрольних тканин молочної залози. Середнє значення відносного рівня експресії цільового гена при фіброзно-кістозній хворобі (ФКХ) на кожному з графіків відповідає точці перетину осей ординат і абсцис. *ИКП* – інвазивна карцинома протоків; *ИКД* – інвазивна карцинома дольок; *МК* – медулярна карцинома молочної залози; * $p < 0,05$

Порівняльний аналіз імунореактивності рекомбінантних аутоантигенів *МКМЗ* у сироватках крові пацієнтів, хворих на *РМЗ*, та рівня експресії відповідних генів у пухлинах *РМЗ* аутологічних пацієнтів. У наших попередніх роботах досліджено наявність антитіл проти антигенів *МКМЗ* *RAD50*, *FAM50*, *HMGN2*, *PABPC4* і *RBPJ* у сироватках крові пацієнтів, хворих на *КМЗ*, та здорових донорів із використанням імуноферментного аналізу [8]. У цій роботі вивчено можливість існування кореляції між змінами у рівні експресії п'яти генів *RAD50*, *FAM50A*, *HMGN2*, *RBPJ* і *PABPC4* і наявністю імунної відповіді проти їхніх білкових продуктів. Для цього проаналізовано парні (аутологічні) зразки пухлин і сироваток крові, отримані від 17 пацієнтів із *КМЗ*.

Незважаючи на декілька збігів стосовно наявності позитивної імунної відповіді проти антигенів *RBPJ* і *RAD50* та змінами експресії їхніх генів (табл. 5), можна зробити висновок, що змінена експресія генів не корелює з існуванням імунної відповіді. Отримані нами дані підтверджують припущення авторів роботи [3] відносно того, що зміни в експресії генів не є обов'язковою передумовою для виникнення імунної відповіді проти їхніх білкових продуктів [3]. Для остаточного вирішення питання щодо причин імуногенності ПАА потрібно дослідити експресію цільових антигенів із використанням більшої кількості зразків *КМЗ*, у тому числі на рівні білка, оскільки рівень мРНК не завжди корелює із кількістю відповідного білкового продукту [20].

Таким чином, із використанням методу кількісної ПЛР показано, що три гени (*DEK*, *RAD50* і *BRAP*) з дев'яти досліджених генів SEREX-антигенів мали достовірно відмінний рівень експресії у тканинах КМЗ порівняно з тканинами пацієнтів з фіброзно-кістозними хворобами.

У тканинах КМЗ з урахуванням їхніх гістологічних типів диференційний профіль експресії відносно тканин пацієнтів з ФКХ зареєстровано для шести генів (*RAD50*, *HMG2*, *RBPJ*, *PABPC4*, *BRAP* і *DEK*).

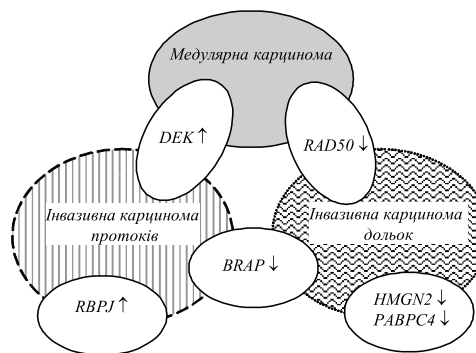


Рис. 2. Блок-схема диференційного профілю експресії шести генів у карциномах молочної залози різних гістологічних типів

Таблиця 5

Порівняльний аналіз реактивності сироваток і рівня експресії генів пухлиноасоційованих антигенів у 17 парних аутологічних сироватках крові та зразках пухлин пацієнтів, хворих на карциному молочної залози

Фактор	Антиген				
	RAD50	FAM50A	HMG2	RBPJ	PABPC4
Імунореактивність	5/17	0/17	0/17	2/17	0/17
Підвищена експресія	1/17	6/17	2/17	4/17	1/17
Кореляція з імунореактивністю	0/17	0/17	0/17	1/17	0/17
Знижена експресія	7/17	5/17	6/17	1/17	7/17
Кореляція з імунореактивністю	2/17	0/17	0/17	0/17	0/17

Результати аналізу експресії гена *SLC34A2* у різних гістологічних типах КМЗ свідчать про його підвищену експресію у майже третині карцином молочної залози (11 з 35), що є важливим для виявлення частини пацієнтів, хворих на рак МЗ, чутливих до терапії моноклональними антитілами MX35 [16].

Нами не встановлено прямого зв'язку між імунореактивністю п'яти антигенів КМЗ (*RAD50*, *FAM50A*, *HMG2*, *RBPJ* і *PABPC4*) у сироватках пацієнтів, хворих на КМЗ, та зміненним рівнем експресії їхніх генів в аутологічних пухлинах МЗ.

Отже, отримані дані дозволяють припустити, що антигени *RAD50*, *HMG2*, *RBPJ*, *PABPC4*, *BRAP* і *DEK* є потенційними діагностичними маркерами та можливими мішенями для терапії зазначених типів раку, що потребує проведення додаткових досліджень із застосуванням різноманітних методичних підходів, а також більшої кількості тканин МЗ пацієнтів з КМЗ певних гістологічних типів.

Роботу виконано за підтримки Національної Академії Наук України та Державного фонду фундаментальних досліджень України (грант № Ф40.69-2011).

M. A. Shyian^{1,2}, *O. I. Kostianets*^{1,2}, *O. Yu. Tsuvariev*¹, *A. V. Stolyaruk*¹, *S. S. Antoniuk*³, *V. V. Filonenko*¹, *R. G. Kiyamova*¹

The peculiarities of gene expression of medullary breast carcinoma tumor-associated antigens in different types of breast tumors

¹Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine
150, Akademika Zabolotnoho Str., Kyiv, Ukraine, 03143

²Taras Shevchenko Kyiv National University
64, Volodymyrs'ka Str., Kyiv, Ukraine, 01601

³Dnipropetrovs'k Clinical Oncological Center
21, Kosmichna Str., Dnipropetrovs'k, Ukraine, 49100

Summary

Aim. To investigate gene expression profile of human medullary breast carcinoma's tumor-associated antigens in different histological types of breast tumors. To analyze a correlation between alterations in gene expression level and induction of immune response against the corresponding antigens. **Methods.** Real-time polymerase chain reaction. **Results.** Differential gene expression profile of 6 (*RAD50*, *HMG2*, *RBPJ*, *PABPC4*, *BRAP*, *DEK*) medullary breast carcinoma tumor-associated antigens have been revealed in breast tumors of different histological types. Correlation between changes in tumor-associated antigens gene expression level and induction of immune response has not been found. **Conclusions.** The genes of human medullary breast carcinoma tumor-associated antigens with differential expression profile in different histological types of breast tumors are potential diagnostic markers of breast cancer. Alteration of tumor-associated antigens

gene expression level is not a prelude to an immune response against their corresponding protein products.

Keywords: medullary breast carcinoma, tumor-associated antigens, immunoreactivity.

M. A. Шиян, О. И. Костянец, О. Ю. Цуварев, А. В. Столярук, С. В. Антонюк, В. В. Филоненко, Р. Г. Киямова

Особенности экспрессии генов опухоли-ассоциированных антигенов медуллярной карциномы молочной железы в разных типах опухолей молочной железы

Резюме

Цель. Исследовать особенности экспрессии генов девяти опухоль-ассоциированных антигенов медуллярной карциномы молочной железы (МКМЖ) в опухолях молочной железы разных гистологических типов и проанализировать возможность существования корреляции между изменениями в уровне экспрессии генов и наличием иммунного ответа против соответствующих антигенов. **Методы.** Уровень экспрессии генов изучали методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. **Результаты.** Выявлен дифференциальный профиль экспрессии шести (RAD50, HMG2, RBPJ, PABPC4, BRAP и DEK) из девяти исследуемых генов в различных гистологических типах опухолей молочной железы. Корреляции между изменениями в уровне экспрессии генов и наличием иммунного ответа против соответствующих антигенов не обнаружено. **Выводы.** Гены RAD50, HMG2, RBPJ, PABPC4, BRAP и DEK антигенов МКМЖ, имеющих дифференциальный профиль экспрессии в различных гистологических типах опухолей молочной железы, являются потенциальными диагностическими маркерами рака молочной железы. Установлено, что изменение экспрессии исследованных генов не является обязательным условием возникновения иммунного ответа против их белковых продуктов.

Ключевые слова: карцинома молочной железы, опухоль-ассоциированные антигены, иммунореактивность.

REFERENCES

1. Weigelt B., Reis-Filho J. S. Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? // *Nat. Rev. Clin. Oncol.*—2009.—**6**, N 12.—P. 718–730.
2. Brass N., Racz A., Bauer C., Heckel D., Sybrecht G., Meese E. Role of amplified genes in the production of autoantibodies // *Blood.*—1999.—**93**, N 7.—P. 2158–2166.
3. Scanlan M. J., Gout I., Gordon C. M., Williamson B., Stockert E., Gure A. O., Jager D., Chen Y. T., Mackay A., O'Hare M. J., Old L. J. Humoral immunity to human breast cancer: antigen definition and quantitative analysis of mRNA expression // *Cancer Immun.*—2001.—**1**.—P. 4.
4. Chen Y. T., Scanlan M. J., Venditti C. A., Chua R., Theiler G., Stevenson B. J., Iseli C., Gure A. O., Vasicek T., Strausberg R. L., Jongeneel C. V., Old L. J., Simpson A. J. Identification of cancer/testis-antigen genes by massively parallel signature sequencing // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*—2005.—**102**, N 22.—P. 7940–7945.
5. Rapberger R., Perco P., Sax C., Pangerl T., Siehs C., Pils D., Bernthaler A., Lukas A., Mayer B., Krainer M. Linking the ovarian cancer transcriptome and immunome // *BMC Syst. Biol.*—2008.—**2**.—P. 2.
6. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // *Anal. Biochem.*—1987.—**162**, N 1.—P. 156–159.
7. Pfaffl M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR // *Nucleic Acids Res.*—2001.—**29**, N 9.—e45.
8. Kostianets O. I., Shyian M. A., Antoniuk S. V., Demidov S. V., Filonenko V. V., Kiyamova R. G. Allogeneic screening of tumor-associated antigens of human breast cancer // *Biotechnologiya.*—2012.—**5**, N 4.—P. 55–64.
9. Scanlan M. J., Welt S., Gordon C. M., Chen Y. T., Gure A. O., Stockert E., Jungbluth A. A., Ritter G., Jager D., Jager E., Knuth A., Old L. J. Cancer-related serological recognition of human colon cancer: identification of potential diagnostic and immunotherapeutic targets // *Cancer Res.*—2002.—**62**, N 1.—P. 4041–4047.
10. Kiyamova R., Kostianets O., Malyuchik S., Filonenko V., Usenko V., Gurtovyy V., Khozayenko Y., Antonuk S., Old L., Gout I. Identification of tumor-associated antigens from medullary breast carcinoma by a modified SEREX approach // *Mol. Biotechnol.*—2010.—**46**, N 2.—P. 105–112.
11. Kostianets O., Shyian M., Demidov S., Antoniuk S., Gout I., Filonenko V., Kiyamova R. Serological analysis of SEREX-defined medullary breast carcinoma-associated antigens // *Cancer Invest.*—2012.—**30**, N 7.—P. 519–527.
12. Bartkova J., Tommiska J., Oplustilova L., Aaltonen K., Tamminen A., Heikkinen T., Mistrik M., Aittomaki K., Blomqvist C., Heikkila P., Lukas J., Nevanlinna H., Bartek J. Aberrations of the MRE11-RAD50-NBS1 DNA damage sensor complex in human breast cancer: MRE11 as a candidate familial cancer-predisposing gene // *Mol. Oncol.*—2008.—**2**, N 4.—P. 296–316.
13. Privette Vinnedge L. M., McClaine R., Wagh P. K., Wikenheiser-Brokamp K. A., Waltz S. E., Wells S. I. The human DEK oncogene stimulates β -catenin signaling, invasion and mammosphere formation in breast cancer // *Oncogene.*—2011.—**30**, N 24.—P. 2741–2752.
14. Riveiro-Falkenbach E., Soengas M. S. Control of tumorigenesis and chemoresistance by the DEK oncogene // *Clin. Cancer Res.*—2010.—**16**, N 11.—P. 2932–2938.
15. Fulcher A. J., Roth D. M., Fatima S., Alvisi G., Jans D. A. The BRCA-1 binding protein BRAP2 is a novel, negative regulator of nuclear import of viral proteins, dependent on phosphorylation flanking the nuclear localization signal // *FASEB J.*—2010.—**24**, N 5.—P. 1454–1466.
16. Yin B. W., Kiyamova R., Chua R., Caballero O. L., Gout I., Gryshkova V., Bhaskaran N., Souchelnytskyi S., Hellman U., Filonenko V., Jungbluth A. A., Odunsi K., Lloyd K. O., Old L. J., Ritter G. Monoclonal antibody MX35 detects the membrane transporter NaPi2b (SLC34A2) in human carcinomas // *Cancer Immun.*—2008.—**8**.—P. 3.
17. Lituiiev D. S., Kiyamova R. G. Mutations in the gene of human type IIb sodium-phosphate cotransporter SLC34A2 // *Biopolym. Cell.*—2010.—**26**, N 1.—P. 13–22
18. Gryshkova V. S., Filonenko V. V., Kiyamova R. G. Inhibition of sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b function with Mx35 antibody // *Biopolym. Cell.*—2011.—**27**, N 3.—P. 193–198.
19. Chen D. R., Chien S. Y., Kuo S. J., Teng Y. H., Tsai H. T., Kuo J. H., Chung J. G. SLC34A2 as a novel marker for diagnosis and targeted therapy of breast cancer // *Anticancer Res.*—2010.—**30**, N 10.—P. 4135–4140.
20. Gygi S. P., Rochon Y., Franza B. R., Aebersold R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast // *Mol. Cell. Biol.*—1999.—**19**, N 3.—P. 1720–1730.

Received 19.09.12