

УДК 611-013;57.086.835;577.218

ЭКСПРЕССИЯ РАКОВО-ТЕСТИКУЛЯРНЫХ АНТИГЕНОВ СЕМЕЙСТВ *MAGEA* И *MAGEB* В ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТАХ МЫШИ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ *IN VITRO*

© 2015 г. О. Ф. Гордеева

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26

e-mail: olgagordeeva@yandex.ru

Поступила в редакцию 24.11.2014 г.

Окончательный вариант получен 30.12.2014 г.

Раково-тестикулярные антигены экспрессируются в сперматогенных и раковых клетках, а также в плюрипотентных стволовых клетках мыши и человека. Однако роль раково-тестикулярных антигенов семейств *Mage* в регуляции клеточных процессов в эмбриональных клетках практически не известна. В представленной работе был проведен сравнительный количественный анализ экспрессии генов семейств *Magea* и *Mageb* в эмбриональных соматических клетках мыши (эмбриональных фибробластах мыши, МЭФ), длительно культивируемых *in vitro* или подвергшихся воздействиям факторов, ингибирующих и стимулирующих пролиферацию. Проведенный анализ выявил низкую экспрессию раково-тестикулярных антигенов семейств *Mage* в МЭФ и показал, что снижение пролиферативной активности МЭФ в ходе культивирования на поздних пассажах сопровождается незначительным возрастанием уровней экспрессии генов семейств *Magea* и снижением уровней экспрессии генов семейства *Mageb*. Однако при модуляции активности MEK/ERK-сигнального пути и обработке деметилирующим агентом 5-азациитидином экспрессия генов семейств *Magea* и *Mageb* в МЭФ практически не изменялась. Наибольшие изменения уровней экспрессии генов семейств *Magea* и *Mageb* были выявлены только при воздействии митомицина С. Во всех экспериментальных вариантах была выявлена преимущественная цитоплазматическая локализация белков семейств *Mage* как в клетках на стадии синтеза ДНК, так и на других стадиях клеточного цикла. Предположительно, в активно пролиферирующих эмбриональных соматических клетках мыши антигены семейств *Magea* и *Mageb* могут выступать в роли ко-активаторов регуляции пролиферации и других клеточных процессов.

Ключевые слова: раково-тестикулярные антигены, маланомные антигены, *Magea*, *Mageb*, С-мус, пролиферация, MEK/ERK, эмбриональные фибробласты мыши.

DOI: 10.7868/S0475145015030039

ВВЕДЕНИЕ

Функции раково-тестикулярных антигенов (РТА), включающих более 100 генов у человека, до сих пор остаются неизвестными. Специфические паттерны экспрессии РТА млекопитающих в норме ограничены только сперматогенными клетками, эмбриональными и внезародышевыми клетками, но aberrантные паттерны экспрессии обнаружены в большинстве опухолевых клеток различного происхождения. Как и у человека, в геноме мышей были идентифицированы 18 генов семейств *Mage*, восемь из которых были гомологичны генам семейств *MAGE-A* (Melanoma Antigen A) человека, пять — генам *MAGE-B*, два — *MAGE-D*, два — *MAGE-E* и один — *MAGE-L*. Большинство генов семейств *Magea* и *Mageb* (за исключением *Mag-b3*) в геномах мыши и человека

локализованы на X-хромосоме, (De Backer et al., 1995; De Plaen et al., 1999; Ohman Forslund et al., 2001; Osterlund et al., 2000). Нуклеотидные и белковые последовательности генов семейств *Mage* имеют высокую гомологию между членами семейства (83–99% и 65–98% соответственно для *Magea*), тогда как гомология между членами семейств *Magea* и *Mageb* составляет около 35–40% (De Plaen et al., 1999). Нуклеотидные последовательности генов *Mageb1* и *Mageb2* имеют 99% гомологию и кодируют идентичные белки, поэтому они часто обозначаются *Mageb1/2*. Структура гена *Mageb3* указывает на то, что он может являться аутомсомным псевдогеном, который в отличие от других членов семейства локализуется на 3-й хромосоме.

Несмотря на то, что РТА у млекопитающих были идентифицированы более 20 лет назад, мало известно об их свойствах и роли в регуляции различных процессов (Sang et al., 2011). Предшествующие исследования показали, что РТА вовлечены в регуляцию транскрипции генов (Laduron et al., 2004), пролиферативной активности (Jungbluth et al., 2005; Nagao et al., 2003; Ohman Forslund et al., 2001; Por et al., 2010), апоптоза (Marcar et al., 2010) и чувствительности раковых клеток к цитотоксинам (Park et al., 2002). Кроме того, было обнаружено, что РТА могут быть вовлечены в детерминацию и специализацию эмбриональных клеточных линий. Так было установлено, что гены *MAGE-A* и *GAGE* специфически экспрессируются в развитии мужских и женских половых клеток у человека (Aubry et al., 2001; De Plaen et al., 1999; Gaskell et al., 2004; Gjerstorff et al., 2006; Gjerstorff et al., 2007). Экспрессия генов семейств *MAGE/Mage* выявлена в плюрипотентных стволовых клетках мыши и человека, а также в развивающихся нейроэктодермальных и мезодермальных клетках и клетках плаценты у человека (Andrieu et al., 2003; Deponti et al., 2007; Gjerstorff et al., 2008; Jungbluth et al., 2007; Kuwajima et al., 2006; Lifantseva et al., 2011).

Экспрессия РТА семейств *Mage* была в основном исследована в различных раковых клетках *in vitro* или в клинических образцах опухолей разного происхождения (Sahin et al., 2000; Yuasa et al., 2001). Однако практически отсутствуют данные об их экспрессии в нормальных клетках, длительно поддерживаемых в культуре *in vitro* (Cronwright et al., 2005; Gjerstorff et al., 2008; Lifantseva et al., 2011). В нашей предыдущей работе мы предположили, что экспрессия РТА семейств *Mage* может быть ассоциирована с развитием ранних эмбриональных линий, тогда как их aberrантная экспрессия – с патологическими процессами, в частности, с трансформацией и канцерогенезом (Lifantseva et al., 2011). В связи с этим, в представленной работе был проведен сравнительный анализ экспрессии генов семейств *Magea* и *Mageb* в эмбриональных соматических клетках мыши (эмбриональных фибробластах мыши, МЭФ), длительно культивируемых *in vitro* или подвергшихся воздействию факторов, ингибирующих и стимулирующих пролиферацию, для изучения их роли в регуляции клеточных функций.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Культивирование клеток. В работе были использованы эмбриональные фибробласты мыши (МЭФ), полученные из эмбриональной мезенхимы зародышей мышей линии C57Bl/6 на стадии E13.5. Мыши линии C57Bl/6 были получены из питомника лабораторных животных “Пушино” ФИБХ РАН (Пушино, Московская область). Содержание животных и экспериментальные про-

цедуры проводили в соответствии с рекомендациями биоэтического комитета ИБР РАН.

МЭФ культивировали в течение семи пассажей в среде DMEM, содержащей 1мМ L-глутамина, 0.1 мМ заменимых аминокислот и 15% фетальной сыворотки коров (“HyClone”, США). Пассирование МЭФ проводили через каждые 72 ч с использованием 0.05%-го раствора трипсин–ЭДТА для диссоциации клеточных культур (“HyClone”, США). В работе были использованы МЭФ на 1-, 3-, 5- и 7-м пассажах. Для анализа клеточного роста и времени удвоения популяции МЭФ на указанных пассажах высевали в 6-луночные планшеты (Geinerbio, Германия) с плотностью 5 тыс. клеток/см² и затем подсчитывали число клеток после культивирования в течение 72 ч.

Экспериментальные воздействия. Для изучения вовлеченности раково-тестикулярных антигенов семейств *Magea* и *Mageb* в регуляцию пролиферации МЭФ подвергали воздействиям ингибиторов и стимуляторов пролиферации: цитостатика митомицина С (10 мкг/мл) и синтетического ингибитора киназы MEK1 (MEK/ERK-сигнального пути) PD98059 (25 мкМ) (все “Sigma”, США), а также фактора роста фибробластов человека (human fibroblast growth factor, FGF2, 100 нг/мл, “PanBioTech”, Германия). Для анализа эпигенетической регуляции экспрессии антигенов семейств *Magea* и *Mageb* МЭФ обрабатывали деметилирующим агентом 5-азацитидином (5-Azacytidine, 1 мкМ, “Sigma”, США). Для экспериментов МЭФ на 3-м пассаже высевали в 6-луночные планшеты (Geinerbio, Германия) с плотностью 10 тыс. клеток/см² и культивировали в среде с фетальной сывороткой в течение ночи для их полной адгезии и адаптации. На следующий день производили смену среды, содержащей 15% заменителя фетальной сыворотки (Knockout Serum Replacement, “Gibco”, США), добавляли перечисленные вещества и культивировали в течение 24 ч. Для иммуногистохимического анализа и анализа пролиферативной активности МЭФ высевали с той же плотностью в 8-луночные планшеты на стекле (Lab-Tek II Chamber Slide System; Nalge Nunc International, США) и проводили экспериментальные воздействия по описанному выше протоколу.

Выявление пролиферирующих клеток на стадии синтеза ДНК. После завершения экспериментальных воздействий МЭФ культивировали в среде с 10мкМ этинил-дезоксисуридина (EdU, 5-ethynyl-2'-deoxyuridine, Click-iT® EdU Imaging Kit, “Molecular Probes”, США) в течение 1 ч. Выявление клеток, меченных EdU, проводили в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем. В основе метода Click-iT® EdU для выявления клеток в S-фазе клеточного цикла лежит реакция между алкином в EdU и азидом флуоресцентного красителя Alexa Fluor®, катализируемая ионами меди. Продукты этой реакции реги-

Структура праймеров для РВ-ПЦР-анализа экспрессии генов семейств *Magea*, *Mageb* и *C-myc* мыши

Ген	№ последовательности в GeneBank	Прямой и обратный праймеры	Размер ПЦР последов., п.о.
<i>Magea2</i>	NM_020016	5'atcgtatctggagactttgtggac3' 5'gggacctaactggcactgc3'	92
<i>Magea4</i>	NM_020280	5'tcggagccaaggagtag3' 5'tgcacagtgggtcttctgt3'	224
<i>Magea6</i>	NM_020019	5'aaggcttgatcttgagcaga3' 5'ccaccaccagctctcaata3'	131
<i>Magea8</i>	NM_020020	5'ccagttgagatagaggctgaacc3' 5'atggcaaggcaaggcga3'	104
<i>Magea1–8</i>	NM_020015		
	NM_020016	5'cctctgagtctgaagatggt3'	83
	NM_020017	5'ggcagtgacaaggatataggagt3'	
	NM_020280		
	NM_020018		
	NM_020019		
<i>Mageb1</i>	NM_010759	5'aggctccattaagtccaaggtattc3' 5'ggaatctggaaggataagaatgacaac3'	82
	NM_008545	5'cctgttgcccttgacacatg3' 5'gcgttcagcatcaagaagattaag3'	168
<i>Mageb4</i>	NM_001033492	5'gggaatttcgcttagcaatcaagg3' 5'gtggcaagagacagcagatagg3'	159
	NM_028847	5'ggagaatcatccacttctgaagag3' 5'ggttgcggtggtcttattc3'	86
<i>Mageb1–3</i>	NM_010759	5'cagtcacgcaggaggttc3'	193
	NM_031171	5'caggcaggacagcagcatt3'	
	NM_008545		
<i>C-myc</i>	NM_001177352	5'tgatgtggtgtctgtggagaaga3' 5'gcgtagtgtgctggtgagt3'	144
	NM_013556	5'cgtgggcttacctactgtttc3' 5'ggtcataacctggttcatcatcgctaac3'	150

стрируют в ядрах ДНК-синтезирующих клеток при флуоресцентной микроскопии.

Иммунофлуоресцентный анализ. Выявление белков семейств *Mage* проводили после завершения реакции Click-iT® EdU на препаратах, фиксированных 3%-м параформальдегидом в фосфотно-солевом буфере, по стандартной иммуноцитохимической методике. Фиксированные препараты МЭФ обрабатывали в растворе 0.3%-ного тритона X-100 и 4%-ного сывороточного альбумина быка (“Sigma”, США), а затем инкубировали с антителами к белкам семейств *Mage*. Были использованы кроличьи антитела против белков семейств *Mage* мыши и человека в разведениях, рекомендованных производителями (1 : 100, “Santa Cruz Biotechnology”, США). Для иммунофлуоресцентной детекции использовали вторичные антитела цып-

ленка против кроличьих иммуноглобулинов, конъюгированные флуорохромом Alexa 594, в разведении 1 : 900 (Molecular Probes, США). Препараты докрашивали флуоресцентным красителем DAPI для визуализации клеточных ядер. Контрольные препараты МЭФ обрабатывали так же, как и опытные образцы, исключая добавление первичных антител. В качестве позитивного контроля использовали клетки тератокарциномы мыши линии P19 (получены из Банка клеточных культур Института цитологии РАН) и криосрезы семенников половозрелых самцов линии C57Bl6. Подготовку препаратов проводили по методу, описанному в предыдущих наших исследованиях (Гордеева и др., 2011). Окрашенные препараты заключали в среду для иммунофлуоресцентных препаратов (“Ibidi”, Германия), а затем фотографиро-

вали с использованием системы анализа изображений Leica DMRXA2 (“Leica”, Германия).

Анализ генной экспрессии. Анализ экспрессии генов семейств *Magea* и *Mageb* в культивируемых МЭФ проводили с помощью ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР). Тотальную РНК из МЭФ и семенника мыши экстрагировали, используя Trizol (“Invitrogen”) в соответствии с рекомендациями производителя. Концентрацию тотальной РНК в образцах определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop 8000 (ThermoScientific, США). Образцы тотальной РНК обрабатывали ДНКазой (TurboDNA kit, “Ambion”, США) для предотвращения контаминации геномной ДНК. Синтез кДНК проводили с использованием обратной транскриптазы Superscript III (“Invitrogen”, США) и олиго(dT)₁₈ праймеров (“Fermentas”, Литва).

Количественный РВ-ПЦР анализ генной экспрессии проводили на амплификаторе “Applied Biosystems 7500” (США) с использованием набора для проведения РВ-ПЦР с красителем Eva Green (“Синтол”, Россия) по следующему протоколу: предварительная денатурация: 94°C – 5 мин; отжиг праймеров и элонгация: 61°C – 1 мин; денатурация: 94°C – 15 сек, 40 циклов. Для анализа были использованы праймеры, сконструированные на основе данных о структуре исследуемых генов в базах данных GenBank и Ensemble (Таблица). Каждый эксперимент был проведен в трех повторах. Уровень экспрессии генов в каждом образце был нормализован к уровню экспрессии гена гипоксантин-гуанин фосфорибозил трансферазы *Hprt*. Для анализа относительных уровней экспрессии генов семейств *Magea* и *Mageb* использовали программу ABI Relative Quantification Study software (Applied Biosystems, США). При анализе относительных уровней экспрессии генов семейства *Magea* и *Mageb* в МЭФ на разных пассажах в каждом экспериментальном варианте за относительную единицу принимали уровень экспрессии анализируемого гена в МЭФ на 1-м пассаже, а в эксперименте с воздействиями разных факторов – уровень экспрессии в контрольном варианте.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изменение экспрессии генов семейств *Magea* и *Mageb* в МЭФ на разных пассажах. Для выявления возможной роли РТА семейств *Magea* и *Mageb* в регуляции клеточных функций эмбриональных соматических клеток был проведен анализ экспрессии генов *Magea*2, 4, 6, 8 и *Mageb*1,3,4,5, а также суммарных уровней экспрессии генов *Magea*1,2,3,4,5,6,8 (*Magea*1–8) и *Mageb*1,2,3 (*Mageb*1–3) в первичных МЭФ на разных пассажах (пассажи 1, 3, 5, 7), т.е. на разных сроках культивирования *in vitro*.

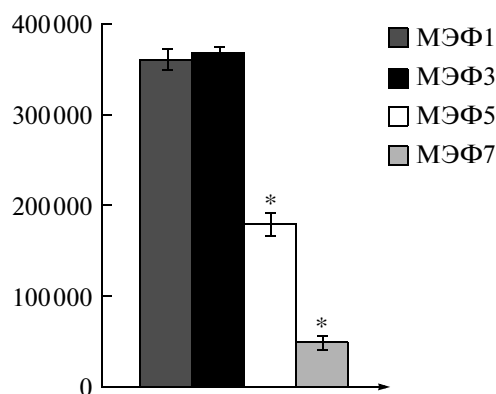


Рис. 1. Скорость роста МЭФ на разных пассажах при культивировании *in vitro*. По оси ординат – число клеток 1-, 3-, 5- и 7-го пассажей после 72 ч культивирования. * – различия с МЭФ1 статистически достоверны при $p < 0.001$, ANOVA.

Известно, что нормальные соматические клетки подвергаются репликативному старению и прекращают размножение при продолжительном культивировании *in vitro*. Изучение клеточного роста МЭФ *in vitro* показало, что в период культивирования от 1-го к 7-му пассажу рост клеток замедлялся, а время удвоения популяции значительно увеличивалось – от 28 ч на 1-м пассаже до отсутствия удвоения через 72 ч на 7-м пассаже (рис. 1). Кроме того, морфологический анализ МЭФ обнаружил увеличение в популяции числа крупных распластаных клеток с большим ядром или двуядерных клеток на 5-м и 7-м пассажах (рис. 2б верхний ряд и окраска DAPI). Несмотря на изменения роста МЭФ, с помощью анализа включения EdU были выявлены клетки в фазе синтеза ДНК даже на 7-м пассаже, что указывает на сохранение пролиферативного потенциала у стареющих МЭФ. С помощью иммунофлюоресцентного анализа был выявлен слабый сигнал при детекции экспрессии антигенов семейства *Mage* в МЭФ на всех изученных пассажах по сравнению с клетками тератокарциномы мыши Р19 и сперматогенными клетками в семенниках мыши (рис. 2 и 3). Причем РТА семейства *Mage* экспрессировались в большинстве МЭФ: как на стадии синтеза ДНК (S-фаза), так и на других стадиях клеточного цикла (рис. 2). В МЭФ была обнаружена преимущественно цитоплазматическая локализация белков *Mage*, выявляемых с помощью использованных антител (рис. 2 и 3).

Сравнительный количественный РВ-ПЦР-анализ профилей экспрессии генов семейств *Magea* и *Mageb* в МЭФ на разных пассажах выявил ряд особенностей в экспрессии изучаемых генов (рис. 3). Следует отметить, что уровни экспрессии генов семейств *Magea* и *Mageb* в МЭФ были значительно ниже (400–4000 раз), чем в семенниках

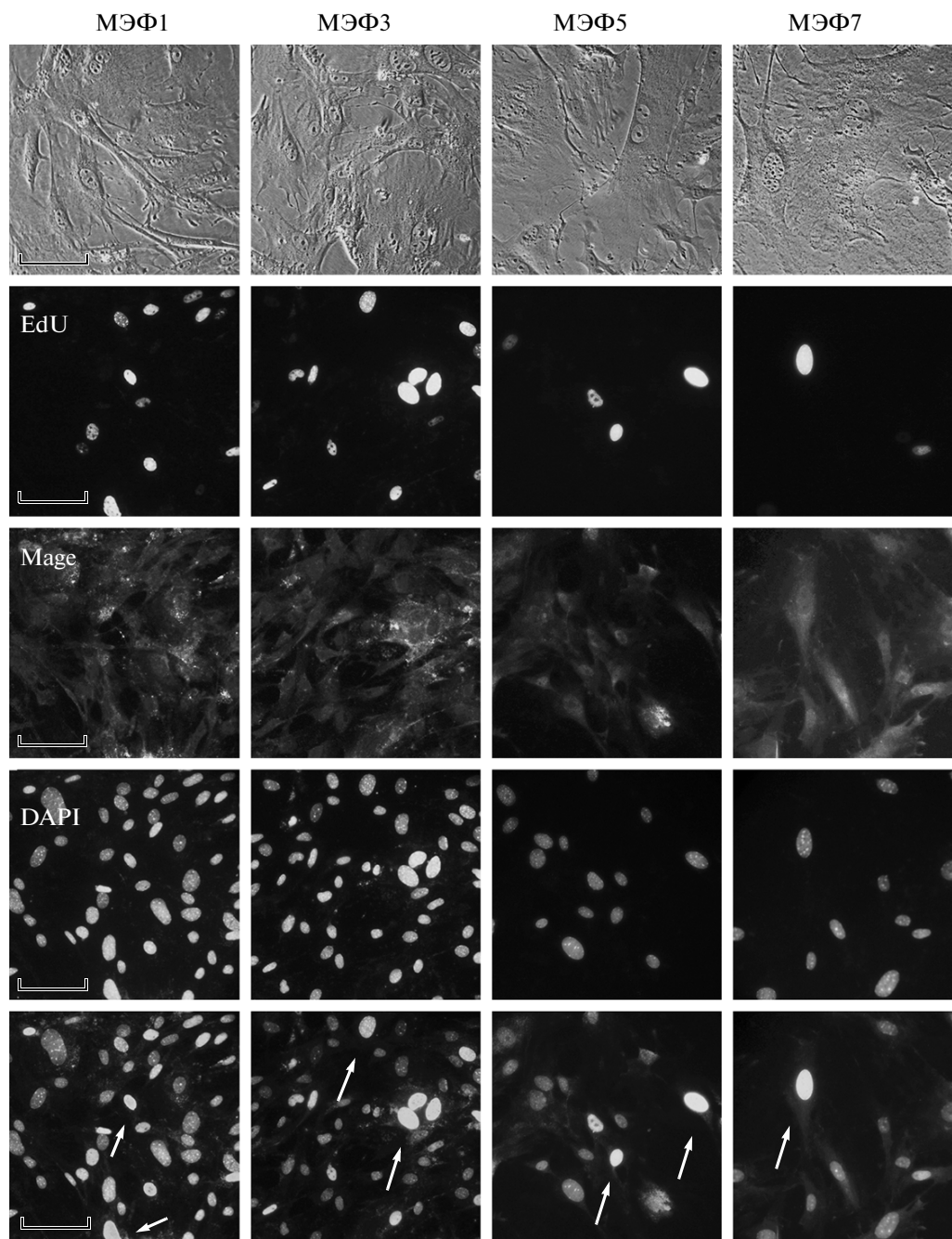


Рис. 2. Анализ морфологии, экспрессии белков Mage и включения EdU в МЭФ на разных пассажах. Тройная окраска препаратов МЭФ: антителами к антигенам Mage, реакция выявления EdU и окраска ядер DAPI. В нижнем ряду рисунка стрелками обозначены клетки с совмещением трех окрасок в МЭФ. Масштаб: 100 мкм.

мышцы (рис. 4а). В целом, уровни экспрессии генов семейств *Magea* и *Mageb* были приблизительно одинаковыми, за исключением гена *Mageb4*, экспрессия которого была значительно ниже и не была выявлена в используемых условиях РВ-ПЦР (рис. 4б, 4в). Анализ уровней экспрессии отдельных генов семейств *Magea* в МЭФ на разных пассажах выявил незначительное возрастание экспрессии *Magea6* и *Magea8* в МЭФ на 5-м и 7-м

пассажах, но не обнаружил различий в экспрессии генов *Magea2* и *Magea4*. При этом суммарная экспрессия генов семейства *Magea* также незначительно возрастала в МЭФ на поздних пассажах (рис. 4б), тогда как экспрессия генов *Mageb1–3* и гена *C-myc* снижалась (рис. 4в). Таким образом, на основании полученных данных по экспрессии РТА семейств Mage можно выявить две тенденции: по мере старения и снижения пролифера-

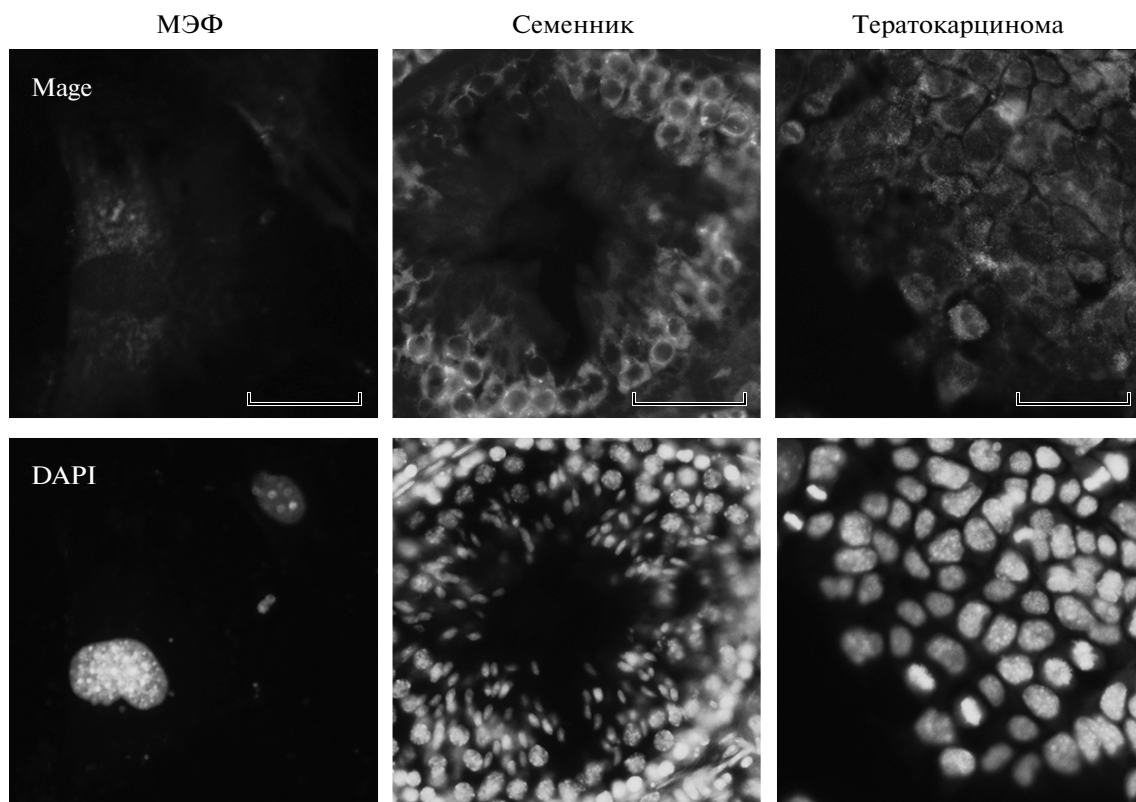


Рис. 3. Анализ экспрессии белков Mage в МЭФ (пассаж 5), клетках тератокарциномы P19 и сперматогенных клетках семенников мыши. Ядра окрашены DAPI. Масштаб: 50 мкм.

тивной активности МЭФ наблюдается незначительное возрастание уровней экспрессии ряда генов семейств *Magea* и снижение уровней экспрессии генов семейства *Mageb*.

Экспрессия генов семейств *Magea* и *Mageb* в МЭФ не зависит от активности MEK/ERK-сигнального пути, но изменяется при воздействии митомидина С. Для установления возможного участия генов семейств *Magea* и *Mageb* в регуляции пролиферации МЭФ была изучена экспрессия этих генов в клетках, подвергшихся воздействию факторов, ингибирующих (митомидина С и PD98059) или стимулирующих (FGF2) пролиферацию, а также деметилирующего агента 5-азациитидина. Иммуногистохимический анализ экспрессии белков Mage и выявление ДНК-синтезирующих клеток показали, что характер экспрессии антигенов семейства Mage не претерпевает существенных изменений при воздействии указанных факторов, хотя число EdU-включивших клеток, как и суммарное число клеток, снижались или возрастали при ингибировании или стимуляции пролиферации соответственно (рис. 5 и 6). Количественный РВ-ПЦР-анализ профилей экспрессии генов семейств *Magea* и *Mageb* не выявил значительных изменений в экспрессии большинства генов во всех экспериментальных вариантах за исключением МЭФ, обработанных митомиди-

ном С (рис. 7). После воздействия митомидина С на МЭФ было обнаружено небольшое возрастание экспрессии генов *Magea6*, как и суммарного уровня экспрессии генов *Magea1–8*, и снижение экспрессии генов семейства *Mageb*, а также *Magea4*, *Magea8* и *C-myc* (рис. 7). Полученные результаты показывают, что регуляция экспрессии генов семейств *Magea* и *Mageb* в МЭФ, по-видимому, мало связана с активностью MEK/ERK-сигнального пути, т.к. активация сигнального каскада с помощью лиганда FGF2 или ингибирование киназы MEK1 не оказывали существенного влияния на уровни экспрессии изучаемых генов семейств *Mage*. Деметилирование геномной ДНК после воздействия 5-азациитидина также не оказывало значительного влияния на экспрессию генов семейств *Magea* и *Mageb* (рис. 7).

Суммируя полученные результаты, можно сделать следующие заключения и предположения. Нормальные эмбриональные соматические клетки МЭФ экспрессируют РТА семейств *Magea* и *Mageb* на очень низком уровне по сравнению со сперматогенными клетками семенников мыши. В процессе длительного культивирования МЭФ подвергаются репликативному старению, которое сопровождается снижением пролиферативной активности. Эти процессы коррелирует со снижением экспрессии генов *C-myc* и *Mageb* и с

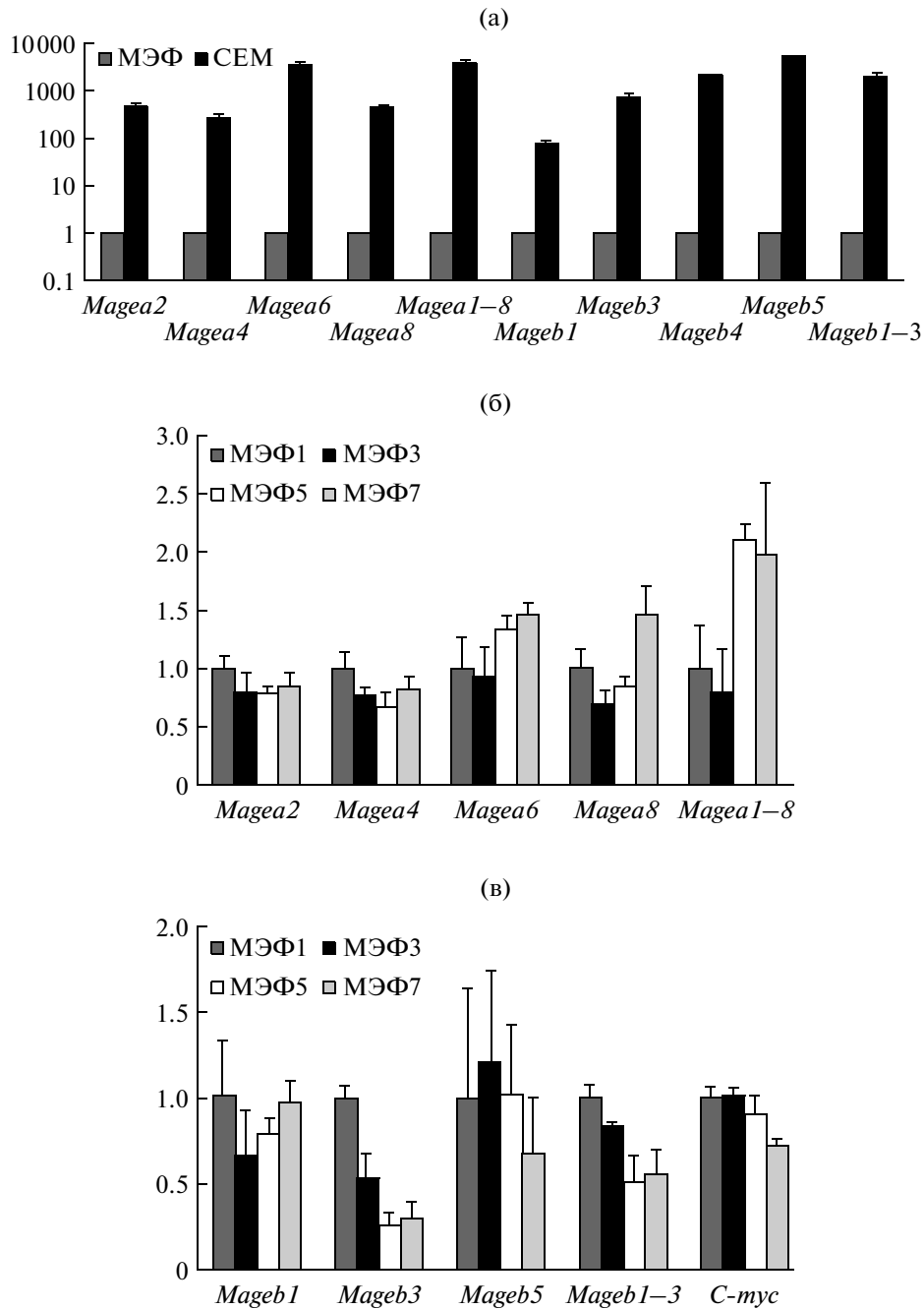


Рис. 4. Сравнительный количественный РВ-ПЦР-анализ экспрессии генов семейств *Magea* и *Mageb* в МЭФ на разных пассажах и в семенниках мыши. (а) – Относительные уровни генной экспрессии, нормализованные к уровню экспрессии гена *Hprt* в МЭФ на 3-м пассаже и в семенниках (СЕМ) мыши. Уровень экспрессии каждого гена в МЭФ принят за относительную единицу. (б) – Относительные уровни экспрессии генов семейства *Magea*, нормализованные к уровню экспрессии гена *Hprt* в каждом образце. Уровень экспрессии каждого гена в МЭФ на 1-м пассаже принят за относительную единицу. (в) – Относительные уровни экспрессии генов семейства *Mageb* и *C-myc*, нормализованные к уровню экспрессии гена *Hprt* в каждом образце. Уровень экспрессии каждого гена в МЭФ на 1-м пассаже принят за относительную единицу.

незначительным повышением экспрессии некоторых генов семейства *Magea*. Однако модуляция активности митогенного сигнального каскада MEK/ERK в МЭФ на ранних пассажах не оказывает существенного влияния на экспрессию генов

семейств *Magea* и *Mageb*, что указывает на отсутствие прямых регуляторных взаимодействий этого сигнального пути и изучаемых РТА в регуляции пролиферации МЭФ, но не исключает их для других митогенных каскадов. Кроме того, деметили-

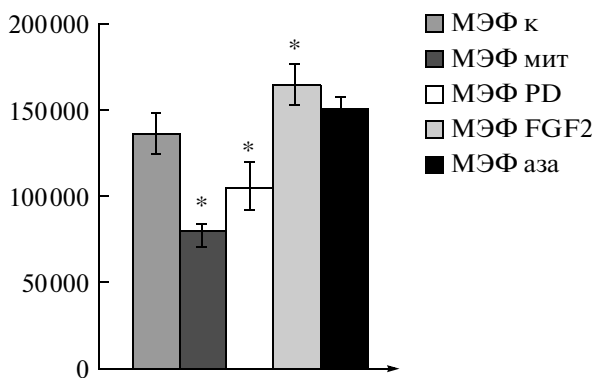


Рис. 5. Скорость роста МЭФ, подвергшихся воздействиям факторов, стимулирующим (FGF2) и ингибирующим пролиферацию (PD98059 и митомин С), а также деметилирующим ДНК (5-азациитидин). По оси ординат: число клеток после воздействия указанных факторов в течение 24 ч. Обозначения: к – контроль, мит– митомин С, PD – PD98059, FGF2 – FGF2, аза – 5-азациитидин. * – различия с контрольными МЭФ статистически достоверны при $p < 0.001$, ANOVA.

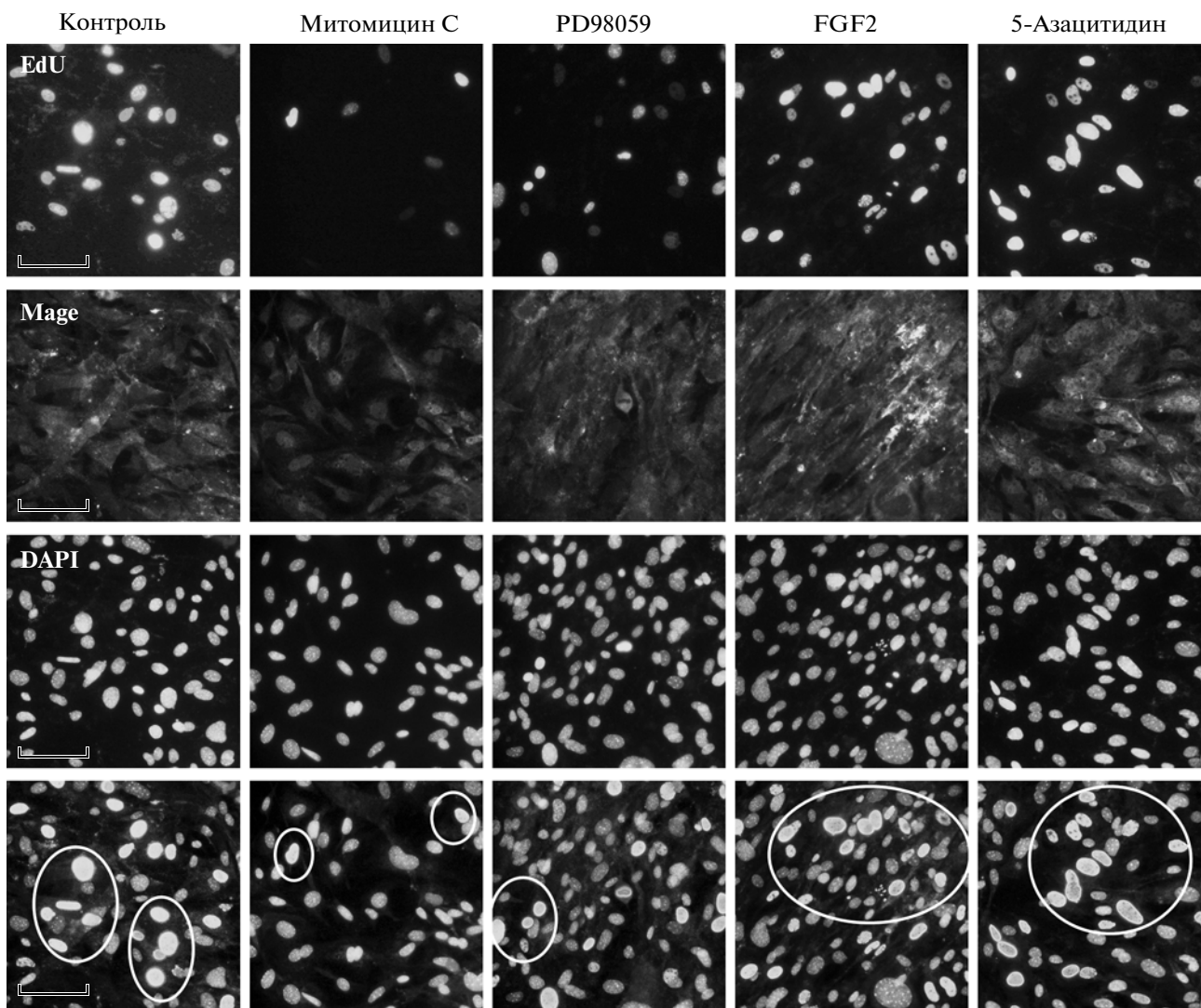


Рис. 6. Экспрессия белков Mage и включение EdU в МЭФ после воздействия факторов, регулирующих пролиферацию, а также 5-азациитидина. Тройная окраска препаратов МЭФ: антителами к антигенам Mage, реакция выявления EdU и окраска ядер DAPI. В нижнем ряду в белых окружностях выделены области с клетками, в которых клетки с яркими белыми ядрами совмещают три окраски в МЭФ Масштаб: 100 мкм.

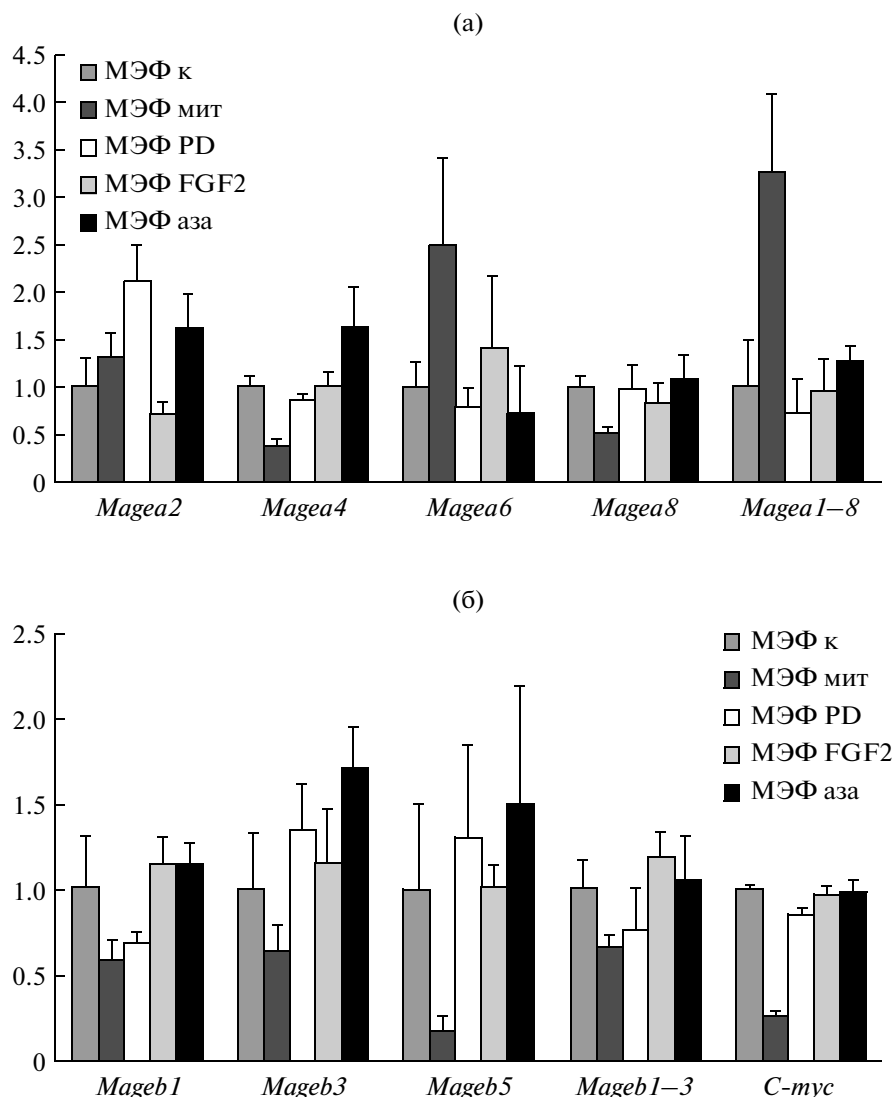


Рис. 7. Количественный РВ-ПЦР-анализ экспрессии генов семейств *Magea* и *Mageb* и *C-myc* в МЭФ после воздействия факторов, стимулирующим и ингибирующим пролиферацию, а также 5-азациитидина. Обозначения см на рис. 4. (а) – Относительные уровни экспрессии генов семейства *Magea*, нормализованные к уровню экспрессии гена *Hprt* в каждом образце. За относительную единицу принят уровень экспрессии каждого гена в контрольных МЭФ. (б) – Относительные уровни экспрессии генов семейства *Mageb* и *C-myc*, нормализованные к уровню экспрессии гена *Hprt* в каждом образце. За относительную единицу принят уровень экспрессии каждого гена в контрольных МЭФ.

рование ДНК МЭФ также не оказывало существенного влияния на экспрессию РТА семейств *Magea* и *Mageb*, хотя ранее было отмечено, что экспрессия генов *MAGE* человека может регулироваться эпигенетически в раковых и эмбриональных стволовых клетках (Kim et al., 2013; Loriot et al., 2008; Serrano et al., 1996; Wischnewski et al., 2006).

Полученные данные и результаты исследований роли РТА в регуляции пролиферации и апоптоза в раковых клетках дают основание предположить, что и в МЭФ экспрессия РТА может быть связана с клеточным ответом на различные стрессовые воздействия, как при клеточном старении

и действии цитостатика митомицина С. Известно, что различные повреждающие факторы (тепловой шок, облучение, гипоксия и факторы, повреждающие ДНК) активируют р53-зависимые пути, которые способствуют остановке клеточного цикла для запуска репарации или апоптоза поврежденных клеток (Eichhorn et al., 2013; Meek, 2009; Riley et al., 2008; Suvorova et al., 2012). Цитостатический эффект белка р53 опосредуется через усиление экспрессии белка-регулятора клеточного цикла р21^{Cip1}. Негативным регулятором экспрессии р21^{Cip1} выступает онкоген *C-myc*, который вместе с Miz-1 связывается с промоторной областью р21^{Cip1} и блокирует экспрессию послед-

него. Было показано, что в клетках гепатокарцином человека С-концевой фрагмент антигена MAGE-A4 также связывается с Miz-1 и обнаруживается в транскрипционном комплексе в промоторной области гена $p21^{Cip1}$, что приводит к усилению про-апоптотических эффектов белка p53 (Sakurai et al., 2004). Однако функциональные взаимодействия между MAGE-A4 и MYC не известны (Nagao et al., 2003; Sakurai et al., 2004). Кроме того, обнаружено, что РТА семейства MAGEA способны ингибировать связывание с хроматином белка p53 и тем самым блокировать иницируемую им экспрессию генов-мишеней $p21$, $MDM2$ и $PUMA$ (Marcar et al., 2010).

Несмотря на то, что не было обнаружено прямого влияния MAGE-A4 на прогрессию клеточного цикла, пролиферацию или апоптоз, тем не менее MAGE-A4, в отличие от MAGE-A1, MAGE-A2 и MAGE-A12, проявлял антипролиферативный эффект в клетках гепатокарцином человека, экспрессирующих белок-онкоген p28 (gankirin) (Nagao et al., 2003). В наших экспериментах с МЭФ на разных пассажах и при воздействии митомицина С были выявлены обратные корреляции в уровнях экспрессии генов *С-тус* и *Magea 1–8* и прямые – для *С-тус* и *Mageb 1–3*, что, возможно, указывает на разные регуляторные эффекты антигенов семейств Magea и Mageb в регуляции клеточных процессов. Подобные разные эффекты на супрессию мейоза и митоза были выявлены для гена *Mageb4* в мужских и женских мейотических половых клетках (Osterlund et al., 2000) и для РТА *Necdin*, взаимодействующего с MAGE антигенами, в постмитотических нейронах зародышей мышей (Aizawa et al., 1992; Aizawa et al., 2011; Andrieu et al., 2003).

Необходимо отметить, что в ряде исследований было обнаружено, что повышенная экспрессия РТА приводит к усилению роста раковых клеток, а ингибирование их экспрессии – к ослаблению клеточного роста (Duan et al., 2003; Low et al., 2010; Por et al., 2010; Suyama et al., 2010; Yang et al., 2007). Однако во многих случаях была также показана корреляция экспрессии РТА с клеточной гибелью. Так, антиген человека MAGEA3 способен ингибировать активность каспазы 12 в миобластах мыши, и благодаря антиапоптотическому эффекту способствовать выживанию клеток (Morishima et al., 2002). Предполагается, что антигены семейства MAGEA способствуют выживанию опухолевых тучных клеток мыши (Yang et al., 2007) и клеток овариальной карциномы человека (Duan et al., 2003), что также позволяет отнести их к группе онкогенов (Sang et al., 2011).

Таким образом, РТА можно рассматривать в качестве кофакторов ключевых регуляторов пролиферации и клеточной гибели в опухолевых клетках. На основе биоинформационного анализа структуры и известных эффектов РТА была

сформулирована гипотеза о том, что РТА играют роль концентраторов в регуляторной белковой сети клеток (так называемые hub-позиции в сети) и способны образовывать новые регуляторные узлы, которые приводят функциональным изменениям в клетках и в отсутствие генетических изменений (Rajagopalan et al., 2011). В соответствии с этой гипотезой и полученными данными мы предполагаем, что в активно пролиферирующих МЭФ РТА семейств Magea и Mageb могут выступать в роли ко-активаторов при регуляции пролиферации и апоптоза, способствуя выживаемости клеток. Дальнейшее изучение их функциональной роли их в обеспечении пролиферативных и антиапоптотических эффектов в плюрипотентных и ранних эмбриональных соматических клеток мыши является предметом наших дальнейших исследований.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 14-04-00419-а). Автор благодарит Н.В. Лифанцеву за техническую помощь при конструировании праймеров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гордеева О.Ф., Лифанцева Н.В., Хайдуков С.В. Паттерны экспрессии генов, специфических для линии половых клеток, в плюрипотентных стволовых клетках мыши и человека связаны с регуляцией базового и первичного статусов плюрипотентности // Онтогенез. 2011. Т. 42. № 6. С. 403–424.
- Aizawa T., Maruyama K., Kondo H., Yoshikawa K. Expression of *necdin*, an embryonal carcinoma-derived nuclear protein, in developing mouse brain // Brain Res. Dev. Brain Res. 1992. V. 68. P. 265–274.
- Aizawa T., Hasegawa K., Ohkumo T., Haga S., Ikeda K., Yoshikawa K. Neural stem cell-like gene expression in a mouse ependymoma cell line transformed by human BK polyomavirus // Cancer Sci. 2011. V. 102. P. 122–129.
- Andrieu D., Watrin F., Niinobe M., Yoshikawa K., Muscatelli F., Fernandez P.A. Expression of the Prader-Willi gene *Necdin* during mouse nervous system development correlates with neuronal differentiation and p75NTR expression // Gene Expr. Patterns. 2003. V. 3. P. 761–765.
- Aubry F., Satie A.P., Rioux-Leclercq N., Rajpert-De Meyts E., Spagnoli G.C., Chomez P., De Backer O., Jégou B., Samson M. MAGE-A4, a germ cell specific marker, is expressed differentially in testicular tumors // Cancer. 2001. V. 92. P. 2778–2785.
- Cronwright G., Le Blanc K., Götherström C., Darcy P., Ehnman M., Brodin B. Cancer/testis antigen expression in human mesenchymal stem cells: down-regulation of SSX impairs cell migration and matrix metalloproteinase 2 expression // Cancer Res. 2005. V. 65. P. 2207–2215.
- De Backer O., Verheyden A.M., Martin B., Godelaine D., De Plaen E., Bresseur R., Avner P., Boon T. Structure, chromosomal location, and expression pattern of three mouse genes homologous to the human MAGE genes // Genomics. 1995. V. 28. P. 74–83.

- De Plaen E., De Backer O., Arnaud D., Bonjean B., Chomez P., Martelange V., Avner P., Baldacci P., Babinet C., Hwang S.Y., Knowles B., Boon T.* A new family of mouse genes homologous to the human MAGE genes // *Genomics*. 1999. V. 55. P. 176–184.
- Deponti D., François S., Baesso S., Sciorati C., Innocenzi A., Broccoli V., Muscatelli F., Meneveri R., Clementi E., Cossu G., Brunelli S.* Necdin mediates skeletal muscle regeneration by promoting myoblast survival and differentiation // *J. Cell Biol.* 2007. V. 179. P. 305–319.
- Duan Z., Duan Y., Lamendola D.E., Yusuf R.Z., Naeem R., Penson R.T., Seiden M.V.* Overexpression of MAGE/GAGE genes in paclitaxel/doxorubicin-resistant human cancer cell lines // *Clin. Cancer Res.* 2003. V. 9. P. 2778–2785.
- Eichhorn T., Hiller C., Hirschfelder K., Frank M., Krauth-Siegel R.L., Müller R., Mertens R., Efferth T.* Identification by high-throughput in silico screening of radio-protecting compounds targeting the DNA-binding domain of the tumor suppressor p53 // *Cancer Genomics Proteomics*. 2013. V. 10. P. 35–45.
- Gaskell T.L., Esnal A., Robinson L.L.L., Anderson R.A., Saunders P.T.K.* Immunohistochemical profiling of germ cells within the human fetal testis: identification of three subpopulations // *Biol. Reprod.* 2004. V. 71. P. 2012–2021.
- Gjerstorff M.F., Johansen L.E., Nielsen O., Kock K., Ditzel H.J.* Restriction of GAGE protein expression to subpopulations of cancer cells is independent of genotype and may limit the use of GAGE proteins as targets for cancer immunotherapy // *Br. J. Cancer*. 2006. V. 94. P. 1864–1873.
- Gjerstorff M.F., Kock K., Nielsen O., Ditzel H.J.* MAGE-A1, GAGE and NY-ESO-1 cancer/testis antigen expression during human gonadal development // *Hum. Reprod.* 2007. V. 22. P. 953–960.
- Gjerstorff M.F., Harkness L., Kassem M., Frandsen U., Nielsen O., Lutterodt M., Møllgård K., Ditzel H.J.* Distinct GAGE and MAGE-A expression during early human development indicate specific roles in lineage differentiation // *Hum. Reprod.* 2008. V. 23. P. 2194–2201.
- Jungbluth A.A., Ely S., DiLiberto M., Niesvizky R., Williamson B., Frosina D., Chen Y., Bhardwaj N., Chen-Kiang S., Old L.J., Cho H.J.* The cancer-testis antigens CT7 (MAGE-C1) and MAGE-A3/6 are commonly expressed in multiple myeloma and correlate with plasma-cell proliferation // *Blood*. 2005. V. 106. P. 167–174.
- Jungbluth A.A., Silva W.A.J., Iversen K., Frosina D., Zaidi B., Coplan K., Eastlake-Wade S.K., Castelli S.B., Spagnoli G.C., Old L.J., Vogel M.* Expression of cancer-testis (CT) antigens in placenta // *Cancer Immun.* 2007. V. 7. P. 15.
- Kim R., Kulkarni P., Hannenhalli S.* Derepression of Cancer/testis antigens in cancer is associated with distinct patterns of DNA hypomethylation // *BMC Cancer*. 2013. V. 13. P. 144.
- Kuwajima T., Nishimura I., Yoshikawa K.* Necdin promotes GABAergic neuron differentiation in cooperation with Dlx homeodomain proteins // *J. Neurosci.* 2006. V. 26. P. 5383–5392.
- Laduron S., Deplus R., Zhou S., Kholmanskikh O., Godelaine D., De Smet C., Hayward S.D., Fuks F., Boon T., De Plaen E.* MAGE-A1 interacts with adaptor SKIP and the deacetylase HDAC1 to repress transcription // *Nucleic Acids Res.* 2004. V. 32. P. 4340–4350.
- Lifantseva N., Koltsova A., Krylova T., Yakovleva T., Poljanskaya G., Gordeeva O.* Expression patterns of cancer-testis antigens in human embryonic stem cells and their cell derivatives indicate lineage tracks // *Stem Cells Int.* 2011. V. 2011. P. 795239.
- Loriot A., Sterpin C., De Backer O., De Smet C.* Mouse embryonic stem cells induce targeted DNA demethylation within human MAGE-A1 transgenes // *Epigenetics*. 2008. V. 3. P. 38–42.
- Low J., Dowless M., Shiyanova T., Rowlinson S., Ricci-Vitiani L., de Maria R., Pallini R., Stancato L.* Knock-down of cancer testis antigens modulates neural stem cell marker expression in glioblastoma tumor stem cells // *J. Biomol. Screen.* 2010. V. 15. P. 830–839.
- Marcar L., Maclaine N.J., Hupp T.R., Meek D.W.* MAGE-A cancer/testis antigens inhibit p53 function by blocking its interaction with chromatin // *Cancer Res.* 2010. V. 70. P. 10362–10370.
- Meek D.W.* Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response? // *Nat. Rev. Cancer*. 2009. V. 9. P. 714–723.
- Morishima N., Nakanishi K., Takenouchi H., Shibata T., Yasuhiko Y.* An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12 // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 34287–34294.
- Nagao T., Higashitsuji H., Nonoguchi K., Sakurai T., Dawson S., Mayer R.J., Itoh K., Fujita J.* MAGE-A4 interacts with the liver oncoprotein gankyrin and suppresses its tumorigenic activity // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 10668–10674.
- Ohman Forslund K., Nordqvist K.* The melanoma antigen genes—any clues to their functions in normal tissues? // *Exp. Cell Res.* 2001. V. 265. P. 185–194.
- Osterlund C., Töhönen V., Forslund K.O., Nordqvist K.* MAGE-b4, a novel melanoma antigen (MAGE) gene specifically expressed during germ cell differentiation // *Cancer Res.* 2000. V. 60. P. 1054–1061.
- Park J., Kong G., Lee S.* hMAGE-A1 overexpression reduces TNF-alpha cytotoxicity in ME-180 cells // *Mol. Cells*. 2002. V. 14. P. 122–129.
- Por E., Byun H., Lee E., Lim J., Jung S., Park I., Kim Y., Jeoung D., Lee H.* The cancer/testis antigen CAGE with oncogenic potential stimulates cell proliferation by up-regulating cyclins D1 and E in an AP-1- and E2F-dependent manner // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. P. 14475–14485.
- Rajagopalan K., Mooney S.M., Parekh N., Getzenberg R.H., Kulkarni P.* A majority of the cancer/testis antigens are intrinsically disordered proteins // *J. Cell. Biochem.* 2011. V. 112. P. 3256–3267.
- Riley T., Sontag E., Chen P., Levine A.* Transcriptional control of human p53-regulated genes // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2008. V. 9. P. 402–412.
- Sahin U., Koslowski M., Türeci O., Eberle T., Zwick C., Romeike B., Moringlane J.R., Schwechheimer K., Feiden W., Pfreundschuh M.* Expression of cancer testis

- genes in human brain tumors // *Clin. Cancer Res.* 2000. V. 6. P. 3916–3922.
- Sakurai T., Itoh K., Higashitsuji H., Nagao T., Nonoguchi K., Chiba T., Fujita J. A cleaved form of MAGE-A4 binds to Miz-1 and induces apoptosis in human cells // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 15505–15514.
- Sang M., Wang L., Ding C., Zhou X., Wang B., Wang L., Lian Y., Shan B. Melanoma-associated antigen genes – an update // *Cancer Lett.* 2011. V. 302. P. 85–90.
- Serrano A., García A., Abril E., Garrido F., Ruiz-Cabello F. Methylated CpG points identified within MAGE-1 promoter are involved in gene repression // *Int. J. Cancer.* 1996. V. 68. P. 464–470.
- Suvorova I.I., Katolikova N.V., Pospelov V.A. New insights into cell cycle regulation and DNA damage response in embryonic stem cells // *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* 2012. V. 299. P. 161–198.
- Suyama T., Shiraishi T., Zeng Y., Yu W., Parekh N., Vessella R.L., Luo J., Getzenberg R.H., Kulkarni P. Expression of cancer/testis antigens in prostate cancer is associated with disease progression // *Prostate.* 2010. V. 70. P. 1778–1787.
- Wischniewski F., Pantel K., Schwarzenbach H. Promoter demethylation and histone acetylation mediate gene expression of MAGE-A1, -A2, -A3, and -A12 in human cancer cells // *Mol. Cancer Res.* 2006. V. 4. P. 339–349.
- Yang B., O'Herrin S., Wu J., Reagan-Shaw S., Ma Y., Nihal M., Longley B.J. Select cancer testis antigens of the MAGE-A, -B, and -C families are expressed in mast cell lines and promote cell viability *in vitro* and *in vivo* // *J. Invest. Dermatol.* 2007. V. 127. P. 267–275.
- Yuasa T., Okamoto K., Kawakami T., Mishina M., Ogawa O., Okada Y. Expression patterns of cancer testis antigens in testicular germ cell tumors and adjacent testicular tissue // *J. Urol.* 2001. V. 165. P. 1790–1794.

Expression of Cancer-Testis Antigens of *Magea* and *Mageb* Families in Mouse Embryonic Fibroblasts Cultured *in vitro*

O. F. Gordeeva

*Kol'tsov Institute of Developmental Biology,
Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia
e-mail: olgagordeeva@yandex.ru*

Received November 24, 2014; in final form, December 30, 2014

Cancer-testis antigens are expressed in the spermatogenic and cancer cells as well as in human and mouse pluripotent stem cells. However, the role of cancer-testis antigens of *Mage* families in the regulation of cellular processes in embryonic cells is largely unknown. In the present study comparative quantitative analysis of the gene expression of *Magea* and *Mageb* families was performed in mouse embryonic somatic cells (mouse embryonic fibroblasts, MEFs), long-term cultured *in vitro* and exposed to factors that inhibit and stimulate proliferation. The analysis revealed low expression of cancer-testis antigens of *Mage* families and showed that a lower proliferative activity of MEF at late passages was accompanied by slight up-regulation of the *Magea* gene expression and down-regulation of *Mageb* gene expression. However, modulation of the activity of MEK/ERK-signaling pathway and DNA demethylation by 5-azacytidine had no significant effects on the expression of *Magea* and *Mageb* genes in MEFs. The most essential changes in the expression levels of *Mageb* and *Magea* genes were found only when MEFs were exposed to mitomycin C. In all experimental variants, predominantly cytoplasmic localization of *Mage* antigens was found in MEFs at the phase of DNA synthesis, as well as at other cell cycle phases. Presumably, in actively proliferating mouse embryonic somatic cells the antigens of *Magea* and *Mageb* families can act as co-activators in the regulation of cell proliferation and other cellular functions.

Keywords: cancer-testis antigens, melanoma antigens, *Magea*, *Mageb*, C-myc, proliferation, MEK/ERK signaling, mouse embryonic fibroblasts