
КРАТКИЕ
СООБЩЕНИЯ

УДК 611-013;57.086.835;577.218

ЭКСПРЕССИЯ РАКОВО-ТЕСТИКУЛЯРНЫХ АНТИГЕНОВ СЕМЕЙСТВА *MAGE* В ООЦИТАХ И РАННИХ ЭМБРИОНАХ МЫШИ

© 2017 г. О. Ф. Гордеева*, В. А. Почаев

*Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН
119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26*

**E-mail: olgagordeeva@yandex.ru*

Поступила в редакцию 25.02.2017 г.

Окончательный вариант получен 06.03.2017 г.

Раково-тестикулярные антигены семейства *Mage* (Меланомные антигены) экспрессируются преимущественно в сперматогенных и раковых клетках, однако некоторые гены этого семейства экспрессируются повсеместно. Паттерны экспрессии и функциональная роль антигенов семейства *Mage* в регуляции клеточных процессов в нормальных эмбриональных и дифинитивных клетках практически не известны. Проведенный сравнительный иммунофлюоресцентный анализ антигенов семейства *Mage* в ооцитах и ранних эмбрионах мыши выявил эти антигены на всех изученных стадиях. Наибольшая интенсивность иммунофлюоресцентного окрашивания была выявлена в эпибласте и внезародышевых структурах яйцевого цилиндра на стадии E6.5. На всех изученных стадиях предзародышевого и раннего развития мыши антигены семейства *Mage* были локализованы преимущественно в цитоплазме. Количественный анализ с помощью ПЦР в реальном времени показал, что уровни экспрессии большинства генов *Mage* в клетках эпибластов и эктоплацентарного конуса были сходными, тогда как уровни экспрессии генов *Mage-a10*, *Mage-b16* и *Mage-b18* были выше в клетках эктоплацентарного конуса, чем в эпибласте. Таким образом, впервые показано, что антигены семейства *Mage* экспрессируются на ранних стадиях развития мыши. Предполагается участие этих антигенов в регуляции самых ранних событий эмбриогенеза.

Ключевые слова: раково-тестикулярные антигены, меланомные антигены, *Mage-a*, *Mage-b*, *Mage-d*, *Mage-e*, *Mage-h*, *Mage-l*, ооцит, бластоциста, эпибласт, эктоплацентарный конус, яйцевой цилиндр

DOI: 10.7868/S047514501704005X

ВВЕДЕНИЕ

Функции раково-тестикулярных антигенов в нормальных и раковых клетках остаются малоизученными. Биологическая роль раково-тестикулярных антигенов РТА в регуляции клеточных процессов была показана для опухолевых клеток различного происхождения, сперматогенных клеток и некоторых эмбриональных клеток и внезародышевых структур, хотя их функции в клетках остаются неясными (Andrieu et al., 2003; Aubry et al., 2001; De Plaen et al., 1999; Deponti et al., 2007; Gaskell et al., 2004; Gjerstorff et al., 2006, 2007; Jungbluth et al., 2005, 2007; Kuwajima et al., 2006; Lifantseva et al., 2011; Marcar et al., 2010; Nagao et al., 2003; Ohman Forslund et al., 2001; Por et al., 2010). Гены меланомных антигенов (Melanoma Antigens, *MAGE*), идентифицированные в геномах человека и других млекопитающих, являются членами группы раково-тестикулярных антигенов, имеют высокую гомологию и локализуются преимущественно на X-хромосоме (De Backer et al., 1995; De Plaen et al., 1999; Osterlund et al., 2000; Ohman Forslund et al., 2001). В состав семейства *MAGE/Mage* вхо-

дят антигены со специфическим паттерном экспрессии в раковых и сперматогенных клетках (подсемейства *MAGE-A/Mage-a*, *MAGE-B/Mage-b*, *MAGE-C*) и антигены, экспрессирующиеся в нормальных и раковых клетках (*MAGE-D/Mage-d*, *MAGE-E/Mage-e*, *MAGE-H/Mage-h*, *MAGE-L/Mage-l*).

Клеточные функции и роли антигенов *Mage* в нормальных развивающихся тканях были исследованы в основном в развитии гонад и нервной системы, а также в развитии плаценты у млекопитающих и человека (Andrieu et al., 2003; Boccaccio et al., 1999; De Plaen et al., 1999; Gjerstorff et al., 2007, 2008; Jungbluth et al., 2007; Kendall et al., 2002; Kuwajima et al., 2006; Mouri et al., 2013; Rogner et al., 1995). Было обнаружено, что гены *MAGE-A* специфически экспрессируются на разных стадиях в развитии мужских и женских половых клеток у человека (Aubry et al., 2001; Gaskell et al., 2004; Gjerstorff et al., 2006, 2007) и мыши (De Plaen et al., 1999; Lifantseva et al., 2011; Hou et al., 2016). Показано, что экспрессия гена *Mage-l2* может быть связана с регуляцией репродуктивной

функции и циркадных ритмов, а также с функциональными нарушениями в центральной нервной системе у мышей (Boscaccio et al., 1999; Bischof et al., 2007; Kozlov et al., 2007; Mercer et al., 2009). Экспрессия генов семейств *MAGE/Mage* также выявлена в плюрипотентных стволовых клетках мыши и человека (Gjerstorff et al., 2008; Lifantseva et al., 2011). Однако отсутствуют данные об участии различных антигенов *Mage* в раннем развитии млекопитающих и других животных. В связи с этим, в представленной работе был проведен сравнительный анализ экспрессии генов семейств *Mage* в ооцитах, доимплантационных и ранних постимплантационных эмбрионах мыши с помощью иммуноцитохимического и ПЦР анализов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение эмбрионов мышей. В работе использовали мышей линии C57Bl/6 8–12-недельного возраста из питомника лабораторных животных НПП “Пушино” ФИБХ РАН. Все эксперименты проводили в соответствии с требованиями биоэтического комитета Института. Ооциты получали при механическом разрушении яичников самок мышей в среде M2 (“Sigma-Aldrich”). Для получения эмбрионов с датированным сроком беременности мышей спаривали в течение ночи, день обнаружения копулятивной пробки считали стадией развития E0.5. Доимплантационные эмбрионы извлекали из яйцеводов и матки при промывании средой M2. Исследовали незрелые ооциты на стадиях первичных фолликулов и герминативного пузырька, морулы (E2.5–3.0), бластоцисты (E3.5 и E4.5) и яйцевые цилиндры на стадии ранней гаструляции (E6.5).

Иммунофлуоресцентный анализ. Выявление белков семейств *Mage* проводили в ооцитах и эмбрионах, фиксированных 3%-м параформальдегидом в фосфатно-солевом буфере (“Sigma-Aldrich”). Образцы последовательно обрабатывали 0.3%-м раствором TritonX100 и 0.1%-м раствором Tween20 в фосфатно-солевом буфере с последующей инкубацией в растворе антител в фосфатно-солевом буфере с 0.1% Tween20 и 3% бычьего сывороточного альбумина фракция V (“Sigma-Aldrich”). Были использованы козы антитела к С-концевому участку антигена *MAGE-A1* человека (sc-12805; “Santa Cruz Biotechnology”), перекрестно реагирующие с антигенами семейства *Mage* мыши, крысы, свиньи, лошади и коровы в разведении 1 : 100. Для иммунофлуоресцентной детекции использовали вторичные антитела цыпленка против иммуноглобулинов козы, конъюгированные с флюорохромом Alexa 594, в разведении 1 : 800 (“Molecular Probes”). Окраску первичными и вторичными антителами проводили при 4°C в течение ночи для доимплантационных эмбрионов и в

течение 2 сут для эмбрионов на стадии яйцевого цилиндра E6.5. Препараты докрашивали флюоресцентным красителем DRAQ5 (1 : 1000; “Molecular Probes”) для визуализации клеточных ядер. Контрольные препараты обрабатывали так же, как и опытные образцы, исключая добавление первичных антител. В качестве позитивного контроля для тестирования антител использовали криосрезы семенников половозрелых самцов линии C57Bl6, подготовленные по методу, описанному в предыдущих наших исследованиях (Гордеева и др., 2015). Окрашенные препараты заключали в среду для иммунофлуоресцентных препаратов (“Ibidi”, Германия).

Конфокальная микроскопия. Анализ препаратов проводили с помощью конфокального микроскопа Leica TSC SP5 с использованием HeNe 594 и HeNe 633 лазеров и объективов APO CS 20.0 × 0.70 IMM UV, HCX PL APO CS 40.0 × 1.25 OIL UV (“Leica Microsystems CMS GmbH”). Изображения в проходящем свете получали в режиме дифференциального интерференционного контраста по Номарскому (DIC). Серии изображений были получены при сканировании образцов с шагом 0.5–1 мкм и обработаны с помощью программы Leica Application Suite (Advanced Fluorescence Lite 2.6.3 build 8173).

Анализ геной экспрессии. Анализ экспрессии генов семейства *Mage* в пост-имплантационных эмбрионах на стадии ранней гаструляции (E6.5) проводили с помощью ОТ-ПЦР и ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР). Для анализа были использованы праймеры, сконструированные на основе данных о структуре исследуемых генов в базах данных GenBank (таблица). Тотальную РНК из эмбрионов экстрагировали, используя Trizol (“Invitrogen”) в соответствии с рекомендациями производителя. Концентрацию тотальной РНК в образцах определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop 8000 (“ThermoScientific”). Образцы тотальной РНК обрабатывали ДНКазой (TurboDNA kit, “Ambion”) для предотвращения контаминации геномной ДНК. Синтез кДНК проводили с использованием обратной транскриптазы Superscript III (“Invitrogen”) и олиго(dT)₁₈ праймеров (“Fermentas”).

ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) проводили в образцах эпибластов на стадии E6.5 ($n = 3$) с использованием набора для ПЦР с полимеразой Colored Taq DNA (“Силекс”, Россия) на амплификаторе Eppendorf master cycler (“Eppendorf”, Германия) по следующей программе: предварительная денатурация — 94°C, 5 мин; 35 циклов — 94°C, 20 с, 60°C, 20 с, 72°C, 20 с; финальная элонгация — 72°C, 10 мин. Продукты ОТ-ПЦР разделяли в 1.5%-ном агарозном геле и трис-боратном буфере (×0.5, pH 8.3) и регистрировали с помощью трансиллюминатора (“BioRad”).

Структура праймеров для РВ-ПЦР-анализа экспрессии генов семейств *Mage*

Ген	Последовательность в GenBank	Прямой и обратный праймеры	Размер ПЦР последов., п.о.
<i>Mage-a2</i>	NM_020016.1	5' atcgtatctggagactttgtggac 3' 5' gggacctaactggcactgc 3'	92
<i>Mage-a4</i>	NM_020280.2	5' ctggtctctggcattggcat 3' 5' cctgtcttgggcttactctgaac 3'	122
<i>Mage-a6</i>	NM_020019.3	5' aaggcttggatcttgagcagat 3' 5' cttacctggggttagaagggaaa 3'	80
<i>Mage-a8</i>	NM_020020.4	5' ttgagatatagaggctgaacctcca 3' 5' ggcgaactccttccaagactc 3'	88
<i>Mage-a10</i>	NM_001085506.1	5' agcagagagagccacacct 3' 5' gaccagagaccttgagtctc 3'	159
<i>Mage-b1</i>	NM_010759.1	5' aggtctcattaagtccaaggtatc 3' 5' ggaatctggaaggataagaatgacaac 3'	82
<i>Mage-b3</i>	NM_008545.2	5' cctgttgccttgacctatg 3' 5' gcgttcagcatcaagaagattaag 3'	168
<i>Mage-b4</i>	NM_001033492.2	5' ggggaatttcgcttagcaatcaagg 3' 5' gtggcaagagacagcagatagg 3'	159
<i>Mage-b5</i>	NM_028847.1	5' ggagaatcatccacttctgaagag 3' 5' gggtgcggtggtccttattc 3'	86
<i>Mage-b16</i>	NM_001113734.1	5' accagccaatagccaatagtga 3' 5' tcttctcaatcagtcctcttca 3'	166
<i>Mage-b18</i>	NM_173783.3	5' tgagacaacttcacaagtcattgc 3' 5' tcacgggcacggagtgtg 3'	196
<i>Mage-d1</i>	NM_019791.2	5' ttcatcgagagggtcagaagaga 3' 5' agcatccagagcatccaagg 3'	90
<i>Mage-d2</i>	NM_001199246.1	5' gctcgtctcagggcaaa 3' 5' aagttctgggtcacggtaaa 3'	77
<i>Mage-e1</i>	NM_053201.4	5' aagattagagagcaaggcaagga 3' 5' gcgagcagcagcattcag 3'	148
<i>Mage-e2</i>	NM_053206.2	5' ggaggctgtggaagatgagg 3' 5' cgtcagatggaaccgaagaaga 3'	75
<i>Mage-h1</i>	NM_023788.3	5' gctggcgtttgcggttca 3' 5' gctcttgcgattgttgcgattc 3'	184
<i>Mage-l2</i>	NM_013779.2	5' ccacacttacatcatcgtaacaa 3' 5' aggtcaagaccacatcag 3'	105
<i>Hprt</i>	NM_013556	5' ttgggttacctactgcttcc 3' 5' ctaatcacgacgtgggactg 3'	125

Для оценки экспрессии генов семейства *Mage* в эпибластах и эктоплацентарных конусах эмбрионов на стадии E6.5 сравнивали уровни их относительной экспрессии, принимая за относительную единицу уровень экспрессии каждого гена в эпибластах. Количественный РВ-ПЦР анализ генной экспрессии проводили на амплификаторе AB 7500 ("Applied Biosystems") с использованием

набора для проведения РВ-ПЦР с красителем SYBR Green ("Евроген", Россия) по следующему протоколу: предварительная денатурация – 94°C, 5 мин; отжиг праймеров и элонгация – 60°C, 1 мин; денатурация – 94°C, 15 с, 40 циклов. Каждый эксперимент был проведен в трех повторах. Уровень экспрессии генов в каждом образце был нормализован к уровню экспрессии гена гипо-

ксантин-гуанин фосфорибозил трансферазы, *Hprt*. Для анализа относительных уровней экспрессии генов семейства *Mage* использовали программу ABI Relative Quantification Study software ("Applied Biosystems", США). Для статистического анализа использовали усредненные значения по трем экспериментам с использованием ANOVA и Tukey post-hoc test в программе R v. 3.2.3 (<http://www.r-project.org>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экспрессию генов семейства *Mage* в ооцитах и доимплантационных эмбрионах изучали с помощью иммунофлюоресцентного анализа экспрессии белков, используя поликлональные антитела против антигенов *Mage*. Используемые антитела получены на основе эпитопа С-концевого участка антигена MAGE-A1 человека и перекрестно реагируют с большим спектром антигенов семейства *Mage*: как специфических раково-тестикулярных антигенов подсемейств *Mage-a* и *Mage-b*, так и широко экспрессирующихся генов подсемейств *Mage-d*, *Mage-e*, *Mage-h1* и *Mage-l2* мыши. В связи с этим иммунофлюоресцентная реакция отражала суммарную экспрессию этих антигенов в ооцитах и эмбрионах мыши изучаемых стадий развития (рис. 1). Локализация специфического иммунофлюоресцентного сигнала была установлена преимущественно в цитоплазме, аналогично описанной ранее для эмбриональных фибробластов и тератокарциномных клеток (Гордеева, 2015). В незрелых ооцитах на стадии первичных фолликулов интенсивность иммунофлюоресцентного сигнала была выше в фолликулярных клетках, чем в ооцитах (рис. 1а). На стадиях экспонированной (E3.5) и вылупившейся из *zona pellucida* (E4.5) бластоцист окраска была выявлена и в эмбриобласте, и в трофобласте (рис. 1г, 1д). По наблюдаемому характеру окраски можно предположить, что экспрессия антигенов семейства *Mage* возрастает от стадии неоплодотворенных яйцеклеток до стадии бластоцисты, так как окраска производилась в одинаковых условиях. Интенсивность окраски была невысокая, что может свидетельствовать как о низком уровне экспрессии белков *Mage*, так и о низкой реактивности используемых антител. Однако полученные данные свидетельствуют, что на всех изученных стадиях раннего развития и в незрелых ооцитах мыши экспрессируются антигены семейства *Mage*.

Иммунофлюоресцентный анализ эмбрионов на постимплантационной стадии E6.5 выявил окрашивание антителами против антигенов семейства *Mage* в эмбриональных и внезародышевых структурах (рис. 2а, 2б). Интенсивность окраски была сходной в клетках эпибластов и эктоплацентарного конуса. Проведенный количественный РВ-ПЦР

анализ в реальном времени также показал, что уровни экспрессии большинства генов *Mage* в клетках эпибластов и эктоплацентарного конуса были сходными, однако уровни экспрессии генов *Mage-a10*, *Mage-b16* и *Mage-b18* были статистически достоверно выше в клетках эктоплацентарного конуса, чем в эпибластах, хотя различия не превышали 2.5–4.5 раз (рис. 2г). Эти данные показывают, что на ранних стадиях развития экспрессия большинства генов *Mage* в эмбриональных и внезародышевых структурах мало различается.

Суммируя полученные результаты, можно сделать следующие заключения и предположения. Вероятно, в ранних эмбриональных клетках на стадиях морул и бластоцист антигены семейств *Mage* экспрессируются на более высоком уровне, чем в ооцитах. В клетках эмбрионов предгастрональных стадий развития паттерны экспрессии генов семейства *Mage* сходны в эмбриональных (внутренних клеточных массах и эпибластах) и внезародышевых структурах (трофобласте, внезародышевой энтодерме и эктоплацентарном конусе). Сходство паттернов экспрессии генов семейства *Mage* в эпибластах и эктоплацентарных конусах подтверждается и при сравнении уровней экспрессии отдельных генов с помощью РВ-ПЦР. Полученные данные показали, что в эмбриональных и внезародышевых структурах мРНК генов субсемейств *Mage-a* и *Mage-b*, а также *Mage-h1* и *Mage-l2* экспрессируется на низком уровне, тогда как мРНК генов *Mage-d1*, *Mage-d2* и *Mage-e1* экспрессируются на уровне, сопоставимом или выше уровня экспрессии гена домашнего хозяйства *Hprt*.

Результаты предыдущих исследований роли раково-тестикулярных антигенов *Mage* в регуляции пролиферации и апоптоза в раковых клетках дают основание предположить, что и в ранних эмбриональных клетках млекопитающих на стадиях дробления их экспрессия может быть связана с участием в регуляции клеточных делений, гибели и выживаемости. В предыдущих исследованиях было выявлено участие антигенов MAGE-A4/*Mage-a4* в регуляции клеточной пролиферации или апоптоза. В клетках гепатокарциномы человека белок MAGE-A4 был обнаружен в составе транскрипционного комплекса в промоторной области гена *p21^{Cip1}*, что указывает на его вовлеченность в регуляцию пролиферации и про-апоптотических эффектов белка *p53* (Sakurai et al., 2004). Усиление экспрессии гена *MAGE-A4* также способствовало росту и ингибировало апоптоз спонтанно трансформированных нормальных кератиноцитов NOK-SI, что сопровождалось репрессией *p53*-зависимых генов *BAX* и *CDKN1A* (Bhan et al., 2012). В различных раковых клетках, антиген MAGE-A4 может стимулировать клеточную гибель через *p53*-зависимый и *p53*-независимый апоптоз (Nagao et al., 2003; Sakurai et al., 2004; Peikert et al., 2006; Marcar

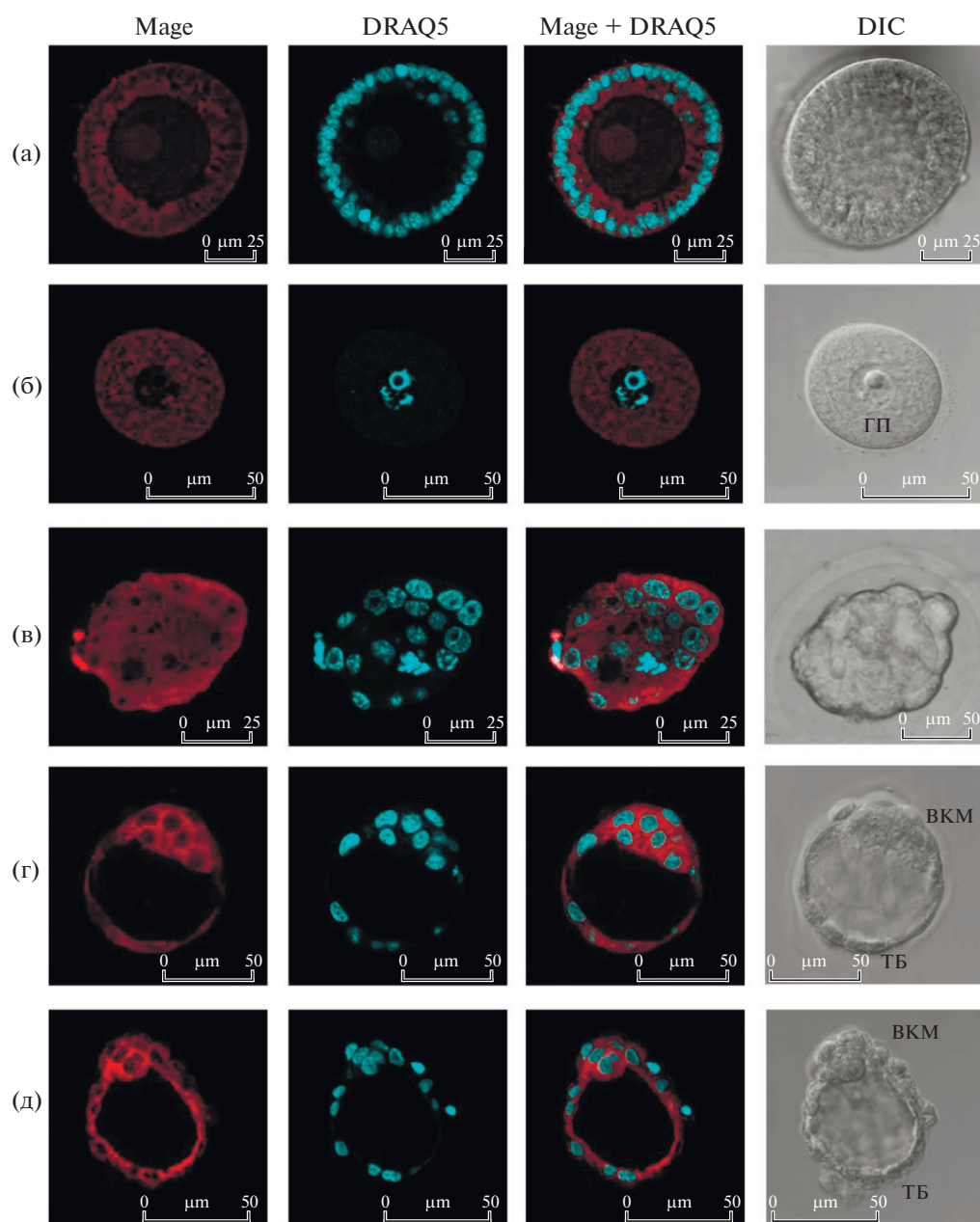


Рис. 1. Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии белков Mage в ооцитах и доимплантационных эмбрионах мыши с помощью конфокальной микроскопии. MAGE — иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к антигенам Mage, DRAQ5 — окрашивание ядер красителем Draq5, DIC — дифференциальный интерференционный контраст по Номарскому. Стадии развития: (а) — ооцит с фолликулярными клетками на стадии первичного фолликула; (б) — ооцит на стадии зародышевого пузырька; (в) — морула на стадии E2.5; (г) — бластоциста на стадии E3.5; (д) — бластоциста, вылутившаяся из zona pellucida, на стадии E4.5. Обозначения: ГП — герминативный пузырек; ВКМ — внутренняя клеточная масса; ТБ — трофобласт.

et al., 2010), а в нормальных миобластах мыши антиген человека MAGEA3 участвовал в ингибировании активности каспазы 12 и благодаря антиапоптотическому эффекту способствовал выживанию клеток (Morishima et al., 2002). Экспрессия генов *MAGE-A4* и *MAGE-A3* была выявлена и в нормальных клетках — в плаценте, фетальных семенниках и эпидермисе человека, что указывает

на их роль в регуляции клеточных процессов в нормальных эмбриональных клетках (Jungbluth et al., 2007; Müller-Richter et al., 2008). Однако экспрессия *Mage-a4*, как и других генов подсемейств *Mage-a* и *Mage-b*, практически не изменялась в эмбриональных фибробластах мыши при клеточном старении *in vitro*, модуляции активности MEK/ERK-сигнального пути и обработке их де-

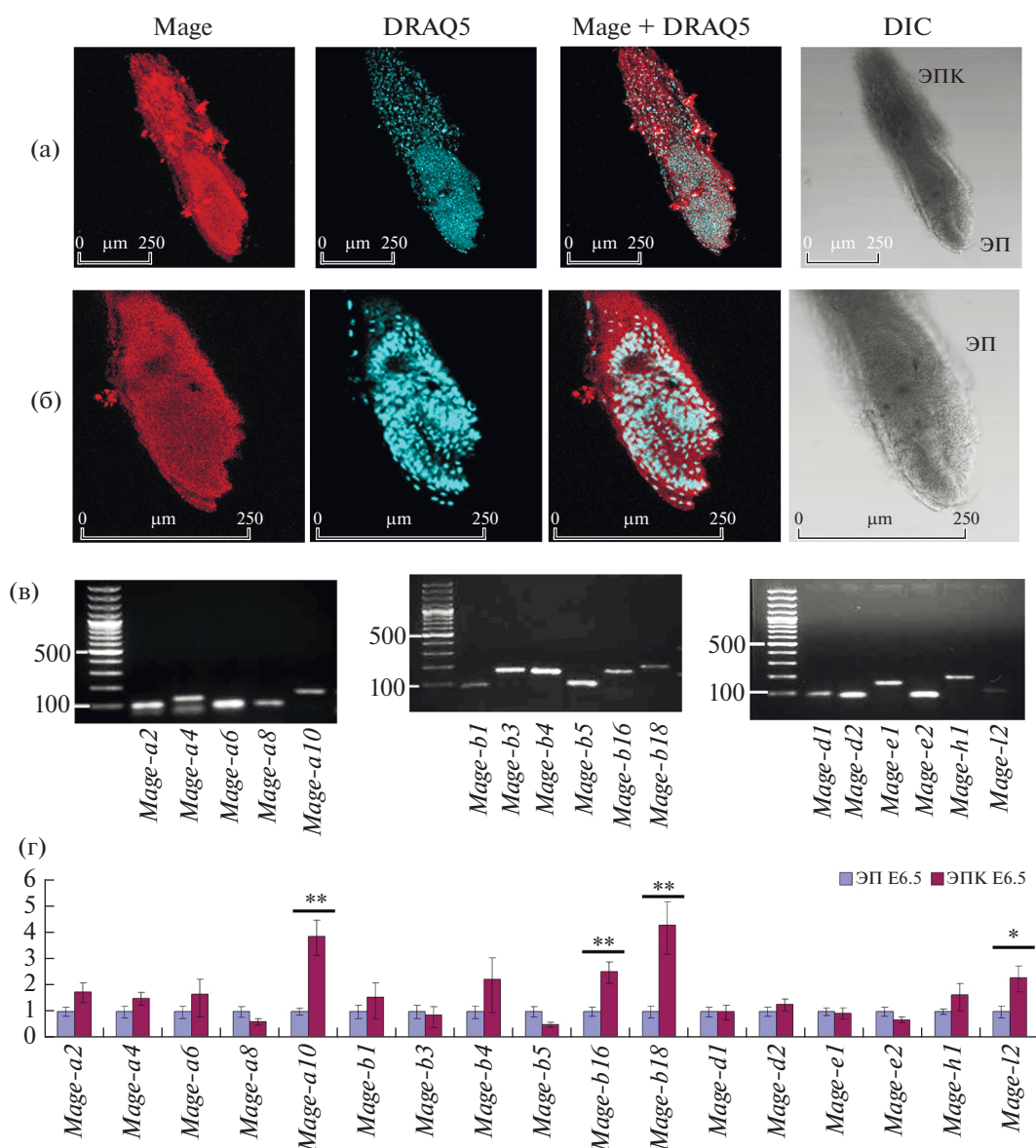


Рис. 2. Иммунофлуоресцентный и ПЦР анализы экспрессии белков Mage в ранних постимплантационных эмбрионах мыши на стадии E6.5. (а, б) — иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к антигенам Mage (обозначения см. рис. 1); (б) — двукратное цифровое увеличение рисунков (а) на уровне эпибласта эмбриона; (в) — ОТ-ПЦР анализ экспрессии генов семейства Mage в эпибластах эмбрионов на стадии E6.5; (г) — РВ-ПЦР анализ экспрессии генов семейства Mage в эпибластах и эктоплацентарных конусах эмбрионов на стадии E6.5; относительные уровни экспрессии генов семейства Mage, нормализованные к уровню экспрессии гена *Hprt* в каждом образце. Уровень экспрессии каждого гена в эпибластах эмбрионов на стадии E6.5 принят за относительную единицу. * — $p < 0.05$, ** — $p < 0.01$ (ANOVA). Обозначения: ЭП — эпибласт; ЭПК — эктоплацентарный конус.

метилирующим агентом 5-азациитидином (Гордеева, 2015).

Кроме того, участие генов подсемейства *MAGE-D* также было показано в регуляции клеточных процессов в нормальных и раковых клетках. Так, экспрессия *MAGE-D1* выявлена в развивающихся нейроэпителиальных клетках и дифференцирующихся клетках субвентрикулярной области (Kendall et al., 2002; Mouri et al., 2013). В различных раковых клетках было обнаружено участие *MAGE-D1*

в ингибировании пролиферации, миграции и инвазии в ткани, а также выявлена корреляция его экспрессии с экспрессией белков p53, p21, E-кадгерина в клетках рака молочной железы (Wen et al., 2004; Tian et al., 2005; Shen et al., 2007; Du et al., 2009).

Таким образом, в соответствии с опубликованными данными и гипотезой о роли раково-тестикулярных антигенов как кофакторов ключевых регуляторов клеточных процессов (Rajagopalan et al.,

2011) мы предполагаем, что и в активно делящихся ранних эмбриональных и внезародышевых клетках антигены семейства Mage могут участвовать в регуляции пролиферации, апоптоза, дифференцировки и морфогенетических преобразований. Однако для установления их функциональной роли в этих процессах необходимы дальнейшие исследования с использованием различных нокаутных и трансгенных моделей.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 14-04-00419-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гордеева О.Ф. Экспрессия раково-тестикулярных антигенов семейств Mage-a и Mage-b в эмбриональных фибробластах мыши, культивируемых *in vitro* // Онтогенез. 2015. Т. 46. № 3. С. 186–197.
- 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.
- Bhan S., Chuang A., Negi S.S., Glazer C.A., Califano J.A. MAGEA4 induces growth in normal oral keratinocytes by inhibiting growth arrest and apoptosis // *Oncol. Rep*. 2012. V. 28. P. 1498–1502.
- Bischof J.M., Stewart C.L., Wevrick R. Inactivation of the mouse *Magel2* gene results in growth abnormalities similar to Prader-Willi syndrome // *Hum. Mol. Genet*. 2007. V. 16. P. 2713–2719.
- Boccaccio I., Glatt-Deeley H., Watrin F., Roëckel N., Lalande M., Muscatelli F. The human *MAGEL2* gene and its mouse homologue are paternally expressed and mapped to the Prader-Willi region // *Hum. Mol. Genet*. 1999. V. 8. P. 2497–2505.
- 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., Cosu G., Brunelli S. *Necdin* mediates skeletal muscle regeneration by promoting myoblast survival and differentiation // *J. Cell Biol*. 2007. V. 179. P. 305–319.
- Du Q., Zhang Y., Tian X., Li Y., Fang W. MAGE-D1 inhibits proliferation, migration and invasion of human breast cancer cells // *Oncol. Rep*. 2009. V. 22. P. 659–665.
- 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.
- Hou S., Xian L., Shi P., Li C., Lin Z., Gao X. The Magea gene cluster regulates male germ cell apoptosis without affecting the fertility in mice // *Sci. Rep*. 2016. V. 6. P. 26735.
- 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.
- Kendall S.E., Goldhawk D.E., Kubu C., Barker P.A., Verdi J.M. Expression analysis of a novel p75(NTR) signaling protein, which regulates cell cycle progression and apoptosis // *Mech. Dev*. 2002. V. 117. P. 187–200.
- Kozlov S.V., Bogenpohl J.W., Howell M.P., Wevrick R., Panda S., Hogenesch J.B., Muglia L.J., Van Gelder R.N., Herzog E.D., Stewart C.L. The imprinted gene *Magel2* regulates normal circadian output // *Nat. Genet*. 2007. V. 39. P. 1266–1272.
- 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.
- 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.
- 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.
- Mercer R.E., Wevrick R. Loss of *magel2*, a candidate gene for features of Prader-Willi syndrome, impairs reproductive function in mice // *PLoS One*. 2009. V. 4. P. e4291.
- Morishima N., Nakanishi K., Takenouchi H., Shibata T., Yasuhiko Y. An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-indepen-

- dent activation of caspase-9 by caspase-12 // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 34287–34294.
- Mouri A., Noda Y., Watanabe K., Nabeshima T. The roles of MAGE-D1 in the neuronal functions and pathology of the central nervous system // *Rev. Neurosci.* 2013. V. 24. P. 61–70.
- Müller-Richter U.D.A., Dowejko A., Zhou W., Reichert T.E., Driemel O. Different expression of MAGE-A-antigens in foetal and adult keratinocyte cell lines // *Oral Oncol.* 2008. V. 44. P. 628–633.
- 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.
- Peikert T., Specks U., Farver C., Erzurum S.C., Comhair S.A.A. Melanoma antigen A4 is expressed in non-small cell lung cancers and promotes apoptosis // *Cancer Res.* 2006. V. 66. P. 4693–4700.
- 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.
- Rogner U.C., Wilke K., Steck E., Korn B., Poustka A. The melanoma antigen gene (MAGE) family is clustered in the chromosomal band Xq28 // *Genomics.* 1995. V. 29. P. 725–731.
- 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.
- Shen W., Xue Q., Wu Y., Hu B., Zhu J., Zhang Y., Su Q. Melanoma-associated antigen family protein-D1 regulation of tumor cell migration, adhesion to endothelium, and actin structures reorganization in response to hypoxic stress // *Cell Commun. Adhes.* 2007. V. 14. P. 21–31.
- Tian X., Rai D., Li J., Zou C., Bai Y., Wazer D., Band V., Gao Q. BRCA2 suppresses cell proliferation via stabilizing MAGE-D1 // *Cancer Res.* 2005. V. 65. P. 4747–4753.
- Wen C., Xue B., Qin W., Yu M., Zhang M., Zhao D., Gao X., Gu J., Li C. hNRAGE, a human neurotrophin receptor interacting MAGE homologue, regulates p53 transcriptional activity and inhibits cell proliferation // *FEBS Lett.* 2004. V. 564. P. 171–176.

Expression of Cancer-Testis Antigens of MAGE Family in Mouse Oocytes and Early Embryos

O. F. Gordeeva* and V. A. Pochaev

Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences
ul. Vavilova, 26, Moscow, 119334 Russia

*e-mail: olgagordeeva@yandex.ru

Received February 25, 2017; in final form, March 6, 2017

Cancer-testis antigens of Mage family (Melanoma antigens) expressed predominantly in the spermatogenic and cancer cells, but some genes of this family are expressed ubiquitously. Expression patterns and functional role of Mage family antigens in the regulation of cellular processes in normal embryonic cells and definitive are virtually unknown. Comparative immunofluorescent analysis of Mage expression was performed in the mouse oocytes and early embryos and identified the expression of Mage antigens at all stages studied. The greatest intensity of the fluorescent staining was detected in the epiblasts and the extraembryonic structures of the egg cylinder at E6.5 stage. In all studied developmental stages of mouse oocyte and early embryo the localization of Mage antigens was found predominantly in the cytoplasm. Quantitative real-time PCR showed that expression levels of most Mage genes in cells of the epiblast and ectoplacental cone were similar, while the gene expression levels of Mage-a10, Mage-b16 and Mage-b18 were higher in cells of the ectoplacental cone than the epiblast. Thus, for the first time our analysis has shown that the Mage family antigens are expressed in the early stages of mouse development and may be involved in the regulation of earliest events of embryogenesis.

Keywords: cancer-testis antigens, melanoma antigens, Mage-a, Mage-b, Mage-d, Mage-e, Mage-h, Mage-l, oocyte, blastocyst, epiblast, ectoplacental cone, egg cylinder