

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-3-78-99>

Особенности регуляции транскрипционной активности генов раково-тестикулярных антигенов при раке желудка

Д.С. Кутилин¹, О.И. Кит¹, А.Ю. Максимов¹, Л.Х. Чалхакян¹, А.В. Дашков¹, С.А. Малинин¹, Г.В. Каминский¹, Т.П. Шкурят²

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России; Россия, 344037 Ростов-на-Дону, ул. 14-я линия, 63;

²ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет»; Россия, 344006 Ростов-на-Дону, ул. Большая Садовая, 105/42

Контакты: Денис Сергеевич Кутилин k.denees@yandex.ru

Введение. Рак желудка остается серьезной проблемой здравоохранения. Гены раково-тестикулярных антигенов (РТ-гены) при данной патологии могут быть перспективными мишенями для иммунотерапии из-за их ограниченной экспрессии в нормальных тканях. Большую роль в регуляции экспрессии РТ-генов при раке желудка играют сети эндогенных конкурентно взаимодействующих РНК (ceRNAs). Эти сети сложны и требуют комплексного биоинформатического и экспериментального анализов.

Цель исследования – биоинформатический анализ с последующей валидацией экспрессии РТ-генов и ее регуляции в злокачественных опухолях желудка.

Материалы и методы. Данные для биоинформатического этапа исследования взяты из базы Gene Expression Omnibus (GEO). Идентификацию дифференциально экспрессирующихся генов осуществляли с помощью GEO2R, микроРНК, таргетирующих гены-мишени, – с использованием метода машинного обучения Random forest. Также проводили анализ взаимодействия микроРНК и длинных некодирующих РНК (lncRNAs). Клиническим материалом для экспериментального этапа исследования послужили опухолевые и условно нормальные ткани 100 пациентов с гистологически подтвержденным диагнозом «рак желудка». Величины относительной экспрессии 6 РТ-генов (*MAGEA10*, *MAGEA2*, *MAGEA12*, *MAGEA3*, *MAGEA6*, *MAGEH1*), а также таргетирующих их микроРНК и lncRNAs определяли методом полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Результаты. С использованием GEO2R обнаружены 18 617 дифференциально экспрессирующихся локусов, включая кодирующие белки гены, микроРНК и lncRNAs. Выявлено изменение экспрессии 6 РТ-генов: *MAGEA10*, *MAGEA2*, *MAGEA12*, *MAGEA3*, *MAGEA6* и *MAGEH1*, взаимодействующих с 40 микроРНК, которые, в свою очередь, взаимодействуют с 17 lncRNAs. В опухолевой ткани пациентов обнаружены повышение экспрессии генов *MAGEA10*, *MAGEA3* и *MAGEA6* ($p < 0,0001$), снижение экспрессии miR-1207-5p, -6858-5p, -3127-3p, -3940-3p, -6807-3p, -3085-3p, -3934-5p, -4488, -4530, -6777-3p и -99a-3p ($p < 0,0001$), увеличение экспрессии miR-7113-3p, miR-874-3p, а также повышение экспрессии *LINC01089*, *AC145285.6*, *GAS5*, *AC005034.3*, *AL691447.2* ($p < 0,001$) и снижение экспрессии *SNHG14*, *AC002101.1*, *SLC9A3-AS1* и *AL118506.1* ($p < 0,001$). На основании полученных данных построена модель регуляторной сети для РТ-генов при раке желудка.

Заключение. Продемонстрированы нарушения в сети конкурентно-взаимодействующих РНК РТ-генов при аденокарциноме желудка. Полученные данные имеют большое значение для понимания фундаментальных механизмов регуляции РТ-генов, а также для совершенствования подходов к иммунотерапии (новые мишени и регуляторные молекулы) и диагностики (новые молекулярные маркеры) этого заболевания.

Ключевые слова: рак желудка, ген раково-тестикулярного антигена, сеть конкурентно-взаимодействующих РНК, экспрессия, некодирующая РНК, молекулярный маркер, мишень иммунотерапии

Для цитирования: Кутилин Д.С., Кит О.И., Максимов А.Ю. и др. Особенности регуляции транскрипционной активности генов раково-тестикулярных антигенов при раке желудка. Успехи молекулярной онкологии 2025;12(3):78–99. DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-3-78-99>

Features of cancer-testicular antigen genes transcriptional activity regulation in gastric cancer

D.S. Kutilin¹, O.I. Kit¹, A.Yu. Maksimov¹, L.Kh. Chalkhakhyan¹, A.V. Dashkov¹, S.A. Malinin¹, G.V. Kaminsky¹, T.P. Shkurat²

¹National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 63 14th Line St., Rostov-on-Don 344037, Russia;

²Southern Federal University; 105/42 Bolshaya Sadovaya St., Rostov-on-Don 344006, Russia

Contacts: Denis Sergeevich Kutilin *k.denees@yandex.ru*

Introduction. Gastric cancer remains a serious public health problem. Cancer-testicular antigen genes (CT-genes) in gastric cancer may be promising targets for immunotherapy due to their limited expression in normal tissues. Competing endogenous RNA networks (ceRNAs) play an important role in regulating CT-gene expression in gastric cancer. These networks are complex and require comprehensive bioinformatics and experimental study.

Aim. To conduct a bioinformatic analysis followed by validation of CT-gene expression and its regulation in malignant gastric tumors.

Materials and methods. Data for the bioinformatics stage were downloaded from GEO. Identification of differentially expressed genes was carried out using GEO2R, microRNA targeting genes – using the Random forest machine learning method. An analysis of the interaction of microRNA and long non-coding RNA (lncRNAs) was also performed. The clinical material for the experimental stage was tissues (tumor and conditionally normal) of 100 patients with a histologically confirmed diagnosis of gastric cancer. The relative expression values of 6 CT-genes (*MAGEA10*, *MAGEA2*, *MAGEA12*, *MAGEA3*, *MAGEA6*, *MAGEH1*), as well as their targeting microRNAs and lncRNAs, were determined using real-time polymerase chain reaction.

Results. Using GEO2R, 18,617 differentially expressed loci were detected, including protein-coding genes, microRNA and lncRNAs. Of these, a change in the expression of 6 CT-genes was revealed – *MAGEA10*, *MAGEA2*, *MAGEA12*, *MAGEA3*, *MAGEA6*, *MAGEH1*, interacting with 40 microRNAs, in turn interacting with 17 lncRNAs. In the patients tumor tissue, an increase in expression of the *MAGEA10*, *MAGEA3* and *MAGEA6* genes ($p < 0.0001$), a decrease in expression of miR-1207-5p, -6858-5p, -3127-3p, -3940-3p, -6807-3p, -3085-3p, -3934-5p, -4488, -4530, -6777-3p, -99a-3p ($p < 0.0001$) and an increase in expression of miR-7113-3p, miR-874-3p, as well as an increase in expression of *LINC01089*, *AC145285.6*, *GAS5*, *AC005034.3*, *AL691447.2* ($p < 0.001$) and decreased expression of *SNHG14*, *AC002101.1*, *SLC9A3-AS1* and *AL118506.1* ($p < 0.001$) was found. Based on the obtained data, a model of the regulatory network for CT-genes in gastric cancer was constructed.

Conclusion. The study showed disturbances in the CT-genes competitively interacting RNA network in gastric adenocarcinoma. The obtained data are important for understanding the fundamental mechanisms of CT-gene regulation, as well as for improving approaches to immunotherapy (new targets and regulatory molecules) and diagnostics (new molecular markers) of this disease.

Keywords: gastric cancer, gene transcriptional activity regulation, network of competitively interacting RNA, expression, non-coding RNA, molecular marker, immunotherapy target

For citation: Kutilin D.S., Kit O.I., Maksimov A.Yu. et al. Features of cancer-testicular antigen genes transcriptional activity regulation in gastric cancer. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2025; 12(3):78–99. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-3-78-99>

ВВЕДЕНИЕ

Рак желудка (РЖ) остается серьезной проблемой здравоохранения, несмотря на снижение заболеваемости и смертности за последние десятилетия. Это одна из самых смертельных злокачественных опухолей, характеризующаяся низкими показателями 5-летней выживаемости. Рак желудка является 5-м по распространенности видом злокачественных новообразований в мире и основной причиной смерти от них, особенно в Азии, где регистрируют около 75 % случаев данной патологии и летальных исходов, связанных с ней [1].

Экспрессия генов при РЖ характеризуется различными паттернами, которые ассоциированы с прогрессированием опухоли, метастазами и неблагоприятным прогнозом. Такие гены, как *COL1A1*, *CDH17*, *APOC1* и *APOE*, часто сверхэкспрессируются в тканях РЖ. Эти гены связаны с инвазией опухоли, метастазами и прогрессированием заболевания [2, 3]. Гены-концентраторы *FN1*, *SPARC* и *SERPINE1* высоко экспрессируются в аденокарциноме желудка, их наличие связано с неблагоприятным прогнозом [4].

Особую группу генов при РЖ, которые вызывают интерес у исследователей в последнее время, состав-

ляют гены раково-тестикулярных антигенов (РТ-гены), кодирующие белки, обычно экспрессирующиеся в зародышевых клетках и различных видах рака, включая РЖ. Они считаются перспективными мишенями для иммунотерапии рака из-за их ограниченной экспрессии в нормальных тканях [5–8].

Например, известно, что при РЖ наблюдается высокий уровень экспрессии генов *MAGE-A1*, *MAGE-A3* и *NY-ESO-1*. При этом *MAGE-A1* и *MAGE-A3* демонстрируют значимые ассоциации с лимфатической и сосудистой инвазиями, что указывает на их потенциальную роль в прогрессии опухоли [9, 10].

Важным, по мнению ряда авторов, является изучение механизмов регуляции экспрессии РТ-генов, так как полученные при этом данные могут быть использованы в иммунотерапии опухолей [5, 6, 10]. При РЖ подобные исследования не проводились.

Большую роль в патогенезе и прогрессировании РЖ играют сети эндогенных конкурентно взаимодействующих РНК (ceRNAs), предполагающих взаимодействия между различными типами РНК, включая длинные некодирующие РНК (lncRNAs), микроРНК (miRNAs) и матричные РНК (mRNAs), которые регулируют экспрессию генов, конкурируя за общие эле-

менты ответа [11]. Сети ceRNA при РЖ сложны, включают многочисленные РНК и взаимодействия. Понимание этих сетей требует комплексного биоинформатического анализа и экспериментальной проверки [12].

Цель исследования — биоинформатический анализ с последующей валидацией экспрессии РТ-генов и ее регуляции в злокачественных опухолях желудка.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Биоинформатический анализ данных. Сведения об экспрессии генов получены из базы данных Gene Expression Omnibus (GEO) (300 образцов РЖ и 100 образцов нормальных тканей желудка (GSE66229, GSE62254)). Дифференциально экспрессирующиеся гены (ДЭГ) в опухолевых и нормальных тканях выявляли с помощью веб-сервиса GEO2R [13], позволяющего сравнить исходные таблицы обработанных данных с использованием пакетов GEOquery и limma R из проекта Bioconductor [14, 15].

Поиск miRNAs, таргетирующих гены-мишени, осуществляли с использованием метода машинного обучения Random forest (метод случайного леса), который сочетает методы бэггинга Бреймана и случайных подмножеств. Модель Random forest позволяет предсказать вероятность того, что miRNA является истинным регулятором конкретного гена [16].

Анализ взаимодействия miRNAs и lncRNAs проводили следующим образом:

- 1) из базы GEO извлечены данные HITS-CLIP, PAR-CLIP и CLASH, которые обработаны с помощью FASTX-Toolkit v.0.0.13 и проанализированы с использованием PARalyzer v.1.1;
- 2) с помощью UCSC LiftOver Tool все координаты сайтов связывания преобразованы в сборки hg19, mm9/mm10 и ce6/ce10. Геномные координаты консервативных сайтов-мишеней miRNA, предсказанные TargetScan, miRanda/mirSVR, PITA, Pictar и RNA22, также собраны и преобразованы в сборки hg19, mm9/mm10 и ce6/ce10 с использованием LiftOver;
- 3) полученные на шаге 2 координаты сравнивали с ранее описанными кластерами CLIP с использованием BEDTools [16].

Для оценки потенциала направленной деградации miRNA под действием lncRNA использовали TDMD-Score.

Пациенты. Клиническим материалом для исследования послужили ткани (опухолевые и условно нормальные) 100 пациентов в возрасте от 35 до 79 лет с гистологически подтвержденным диагнозом «рак желудка»: аденокарциномами G₁₋₂ (n = 60) и G₃ (n = 40) (табл. 1). Образцы тканей получены в процессе хирургических вмешательств, проведенных с 2013 по 2024 г. в Национальном медицинском исследовательском центре онкологии (г. Ростов-на-Дону). Все пациенты, вошедшие в исследование, имели статус по шкале

Таблица 1. Клиническая характеристика пациентов с гистологически подтвержденной аденокарциномой желудка
Table 1. Clinical characteristics of patients with histologically confirmed of gastric adenocarcinoma

Показатель Parameter	Вся когорта Entire cohort (n = 100)	Опухоль G ₁₋₂ Tumor G ₁₋₂ (n = 60)	Опухоль G ₃ Tumor G ₃ (n = 40)
Средний возраст, лет Average, age	65 ± 3,2	68 ± 9,1	62 ± 1,4
Мужской пол, % Male sex, %	72,5	70	75
Локализация, %: Location, %:			
антральный отдел antral part	45	50	35
тело желудка body of the stomach	20	25	10
кардия/проксимальный отдел cardia/proximal part	25	15	35
тотальное поражение Total defeat	5	2	8
Стадия по классификации Tumor, Nodus and Metastasis, %: Tumor, Nodus and Metastasis stage, %:			
I (T1–2N0M0)	10	15	5
II (T1–3N1–3M0)	20	30	10
III (T2–4a/bN0–3M0)	40	35	45
IV (T ^{любая} , N ^{любая} , M1)	30	20	40
IV (T ^{any} , N ^{any} , M1)			
Глубина инвазии, %: Depth of invasion, %:			
T1 (ранний рак) T1 (early cancer)	10	15	5
T2 (поражение мышечного слоя) T2 (lesions in the muscle layer)	15	20	10
T3 (поражение субсерозы) T3 (lesions in the subserosa)	30	25	35
T4a (поражение серозы/висцеральной брюшины) T4a (lesions in the serosa/visceral peritoneum)	25	22	30
T4b (прорастание в соседние органы) T4b (growth into adjacent organs)	20	18	20
Гистологический тип по Lauren, %: Histological type per Lauren, %:			
кишечный intestinal	55	70	35
диффузный diffuse	33	15	50
смешанный mixed type	12	15	15

Восточной кооперативной онкологической группы (Eastern Cooperative Oncology Group, ECOG) от 0 до 2.

Образцы тканей до исследования хранили в жидком азоте на базе централизованного криохранилища Национального медицинского исследовательского центра онкологии. Для верификации образцов проводили стандартное патолого-морфологическое исследование с окрашиванием фиксированных срезов тканей гематоксилином и эозином. Биоптаты тканей после проведения патолого-морфологического исследования разделяли на 2 группы: опухолевые (малигнизированные) и нормальные (немалигнизированные) образцы [17].

Анализ экспрессии генов. Фрагменты ткани гомогенизировали в 300 мкл лизирующего буфера, содержащего 4 М тиоцианата гуанидина, 25 мМ цитрата натрия, 0,5 % саркозила и 0,1 М β-меркаптоэтанола. Выделение суммарной РНК из лизата тканей проводили методом фенол-хлороформной экстракции в нашей модификации: к лизату добавляли 60 мкл 2 М ацетата натрия (рН 4.0) и перемешивали; к полученной смеси добавляли 700 мкл насыщенного водой фенола и перемешивали. Для разделения водной и органической фаз добавляли 200 мкл смеси хлороформа и изоамилового спирта (49:1), перемешивали и инкубировали 15 мин при 4 °С; затем полученную смесь центрифугировали при 10 000g 15 мин при 2 °С, верхнюю водную фазу отбирали в новую пробирку и добавляли равный объем этанола, далее наносили смесь на колонку с фильтром из диоксида кремния (использовали колонки из набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия) (РНК эффективно связывается с мембраной из диоксида кремния). Колонку дважды промывали буфером (4 М гуанидина изотиоцианата, 10 мМ трис-ацетата, 50 % этанола, 1 % 2-меркаптоэтанола) и центрифугировали, дважды промывали буфером (10 мМ трис-НСl; рН 7,5; 0,1 М NaCl; 75 % этанола) и центрифугировали при 400 g 1 мин. Для элюции РНК в ко-

лонку добавляли 120 мкл деионизированной воды с ингибитором РНКаз (1 ед. акт/мкл РНКазина) [18]. Элюат собирали центрифугированием при 400g 10 мин. Для длительного хранения препарат РНК пересаждали 80 % этиловым спиртом, помещали в криобоксы и хранили при –80 °С.

Для очистки от примесей ДНК образцы обрабатывали препаратами ДНКазы I. Концентрацию полученных препаратов РНК измеряли на флуориметре Qubit 2.0 с использованием набора Qubit RNA HS Assay Kit (Invitrogen, США). Для оценки качества полученного препарата РНК проводили электрофорез в 2 % агарозном геле (интенсивность полос 18S и 28S рРНК в соотношении 1:1 свидетельствовала о приемлемом для дальнейшей работы качестве РНК) [19].

Синтез комплементарной ДНК (кДНК) выполняли с использованием коммерческих наборов Reverta-L («ИнтерЛабСервис», Россия) по инструкции производителя. Концентрацию полученных препаратов кДНК измеряли на флуориметре Qubit 2.0 с помощью набора Quant-iT™ dsDNA High-Sensitivity (HS) Assay Kit (Invitrogen, США).

Методом количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени определяли величины относительной экспрессии 6 РТ-генов: *MAGEA10*, *MAGEA2*, *MAGEA12*, *MAGEA3*, *MAGEA6* и *MAGEH1* (табл. 2). При выборе референсного гена использовали алгоритм, описанный Д.С. Кутилиным [20] и J. Vandesompele и соавт. [21]: рассчитывали среднее попарное изменение соотношения экспрессии между 2 генами во всех образцах (M-value) и стабильность (S-value). Чем ниже значение M-value, тем стабильнее ген. Гены ранжировали по возрастанию M-value. Ген с наименьшим значением этого показателя считали наиболее стабильным. S-value рассчитывается по формуле:

$$S\text{-value} = \ln(1/M\text{-value}).$$

Таблица 2. Последовательности праймеров для определения экспрессии генов (Primer-BLAST; дизайн de novo)

Table 2. Primer sequences for gene expression determination (Primer-BLAST; de novo design)

Ген Gene	Последовательность прямого праймера (5'→3') Forward primer sequence (5'→3')	Последовательность обратного праймера (5'→3') Reverse primer sequence (5'→3')
<i>MAGEA2</i>	CGCAGGCTCCGTGAGG	CTGTGTTGACCTGAGTCACCT
<i>MAGEA3</i>	TGAGCAACGAGCGACGG	TCAGCCTGTCCCCTCAGAA
<i>MAGEA6</i>	GGTGAGGAGGCAAGGTTCTG	TTGCAGTGCTGACTCCTCTG
<i>MAGEA10</i>	TCTGTGAGGAGGCAAGGGAG	CTTGTCAGATCCTGCGACCC
<i>MAGEA12</i>	GACGTCGGTGAGGGAAG	TGTCTCCTCAGAACCTGGATG
<i>MAGEH1</i>	GCCTCTAGCAGGAGACATGC	TGAGGCCTGGATTTTTCGAT
<i>GAPDH</i>	GTCAAGGCTGAGAACGGGAA	TCGCCCCACTTGATTTTGA
<i>B2M</i>	AGATGAGTATGCCTGCCGTG	CCATGATGCTGCTTACATGTCTC

Гены с $M\text{-value} < 0,5$ считали идеальными. В качестве референсных выбраны 2 гена: *GAPDH* ($M\text{-value} = 0,047$; $S\text{-value} = 3,057$) и *B2M* ($M\text{-value} = 0,244$; $S\text{-value} = 1,410$).

Полимеразную цепную реакцию в реальном времени (в 3 технических повторах) проводили на термоджеле Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad, США) в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 12 нг кДНК; 0,25 мМ каждого из dNTPs; 2,5 мМ $MgCl_2$; ПЦР-буфер; 1 ед. ДНК-полимеразы *SynTaq*; краситель *EVA-Green* и по 500 нМ прямого и обратного праймеров для референсных генов или гена-мишени по следующей схеме: первичная денатурация при 95 °C в течение 3 мин; 40 циклов — 10 с при 95 °C, 25 с при 60 °C (температура подобрана экспериментальным путем с использованием температурного градиента), 30 с при 72 °C. Специфичность ПЦР контролировали с использованием анализа кривых плавления (melting curve analysis). Относительную экспрессию (RE) рассчитывали по формуле:

$$RE = E^{-\Delta\Delta C_t}$$

где E — эффективность амплификации, рассчитанная по формуле: $E = 10^{-1/k}$ (k — коэффициент из уравнения прямой $C(T) = k \cdot \lg P_0 + b$, полученного путем линейной аппроксимации экспериментальных данных ($E_{\text{среднее}} = 1,968$)).

Нормализацию результатов проводили по 2 референсным генам — *GAPDH* и *B2M* — и уровню экспрессии соответствующих генов-мишеней в образцах нормальной ткани по приведенной ниже схеме:

- 1) нормализация по среднему значению референсных генов: $\Delta C(t) = C(t)_{\text{target}} - C(t)_{\text{g-reference}}$, где $C(t)_{\text{g-reference}}$ — среднее геометрическое $C(t)$ референсных генов (изменялось в диапазоне от 18,1 до 18,9); $C(t)_{\text{target}}$ — среднее геометрическое $C(t)$ генов-мишеней (изменялось в диапазоне от 22,5 до 30,1 в зависимости от гена и типа ткани — норма или опухоль);
- 2) расчет $E^{-\Delta C(t)}$ и медианы $E^{-\Delta C(t)}$ по каждому гену для условно нормальной и опухолевой тканей каждого пациента;
- 3) нормализация по условно нормальной ткани и получение окончательного результата как кратность изменений (fold change, FC) [20] по формуле: $FC = E^{-\Delta C(t)}_{\text{медиана опухолевой ткани}} / E^{-\Delta C(t)}_{\text{медиана нормальной ткани}}$ (что тождественно $E^{-\Delta\Delta C(t)}$, или $E^{-(\Delta C(t)_{\text{медиана опухолевой ткани}} - \Delta C(t)_{\text{медиана нормальной ткани}})}$).

Оценка экспрессии miRNA и lncRNA. Зрелые miRNAs и малую ядерную РНК U6 выявляли с использованием метода, предложенного I. Balcells и соавт. [22]. Выделенную суммарную РНК использовали в реакции обратной транскрипции, которую проводили одновременно с полиаденилированием РНК, с применением специфичных RT-праймеров: 5'-CAGGTCCAGT⁽¹⁵⁾ V-3' (где вместо V могут быть нуклеотиды AA, CA, AC, CC, TC, CT, TT, AT, TA, TG, GT, GG, GC, CG, AG,

GA в зависимости от исходной последовательности miRNA). Полученную кДНК детектировали с помощью ПЦР в реальном времени.

Специфичные олигонуклеотидные праймеры определяли с использованием алгоритма, разработанного ранее [22]. К каждой miRNA подбирали несколько комплектов олигонуклеотидов, из которых выбирали те, которые характеризовались наиболее высокой эффективностью обратной транскрипции и ПЦР. Эффективность обратной транскрипции оценивали по значениям пороговых циклов (C_t), полученных при анализе синтетических аналогов miRNA и mRNA («Биосан», Россия), взятых в известной концентрации. Эффективность амплификации (E) для каждой системы оценивали с помощью калибровочной кривой, используя для анализа разведения соответствующие РНК, выделенные из клинических проб согласно описанному выше протоколу ($E = 2,0$). При анализе стабильности экспрессии для подбора референсных miRNAs применяли алгоритм, описанный выше (для референсных генов) [20]. Первоначальный список предлагаемых нормализаторов включал miR-191 (экспрессия этой miRNA была наиболее стабильной в 13 сравниваемых тканях [23]) и U6 (традиционно используется в качестве отдельного эталона для нормализации данных экспрессии miRNA). С помощью алгоритма для нормализации данных экспрессии miRNA выбран U6 (табл. 3).

Отдельно проводили реакцию обратной транскрипции miRNA в 1 повторе, в которой использовали реакционную смесь, содержащую 1× поли(А)-буфера (New England Biolabs Inc., США); 10 U/мкл обратной транскриптазы MMLV («Синтол», Россия); 0,1 мМ dNTP («Синтол», Россия); 0,1 мМ АТФ (New England Biolabs Inc., США); 1 мкМ RT-праймера; 0,5 U/мкл поли(А)-полимеразы (New England Biolabs Inc., США) и 1 мкг суммарной РНК. Реакцию проводили по следующей схеме: 15 мин при 16 °C, 15 мин при 42 °C; затем обратную транскриптазу инактивировали в течение 2 мин при 95 °C [20].

Изменение относительной экспрессии miRNA оценивали методом ПЦР в реальном времени. Амплификацию проводили в 20 мкл ПЦР-смеси, содержащей 1 × ПЦР-буфера; 0,25 мМ dNTP; 2 мМ $MgCl_2$; 1 ед. акт. Taq-ДНК-полимеразы, по 500 нМ прямого и обратного праймеров. Количественную ПЦР с обратной транскрипцией каждого образца проводили в 3 повторах. Полученные смеси инкубировали в амплификаторе CFX 96 (Bio-Rad Lab, США) по следующей схеме: 2 мин при 94 °C, денатурация — 10 с при 95 °C, отжиг и элонгация — 20 с при 64 °C. Результаты, соответствующие $C_t > 40$, считали отрицательными.

Относительную экспрессию miRNA (RE) рассчитывали по формуле:

$$E^{-\Delta\Delta C_t} (E = 1,988).$$

Нормализацию результатов проводили по референсному локусу и уровню экспрессии соответствующих

Таблица 3. Специфические праймеры для miRNA и малой ядерной РНК U6 (дизайн de novo).

Table 3. Specific primers for miRNA and small nuclear RNA U6 (de novo design)

МикроРНК miRNA	Последовательность праймеров (5'→3') Primer sequence (5'→3')	МикроРНК miRNA	Последовательность праймеров (5'→3') Primer sequence (5'→3')
hsa-miR-1207-5p	F: GTGGCAGGGAGGCT R: CCAGTTTTTTTTTTTTTTC CCCTC	hsa-miR-4313	F: CCCCTGGCCCCA R: GTCCAGTTTTTTTTTTTTT TTGGGT
hsa-miR-5006-3p	F: GCAGTTTCCCTTTCCATCCT R: CCAGTTTTTTTTTTTTTCT GCCA	hsa-miR-4488	F: GGGGGCGGGCT R: GTTTTTTTTTTTTTTTCG CGGA
hsa-miR-6848-5p	F: TGGGGGCTGGGATG R: AGGTCCAGTTTTTTTTTTTT TACC	hsa-miR-4530	F: CCAGCAGGACGGGA R: TCCAGTTTTTTTTTTTTT TCGCT
hsa-miR-6858-5p	F: GGAGGGGCTGGCA R: GGTCCAGTTTTTTTTTTTT TGTC	hsa-miR-4687-5p	F: GCCCTCCTCCCGCA R: GTCCAGTTTTTTTTTTTT TTGGGT
hsa-miR-3127-3p	F: AGTCCCCTTCTGCAGG R: GGTCCAGTTTTTTTTTTTT TCCA	hsa-miR-4695-5p	F: GAGGCAGTGGGCGA R: CCAGTTTTTTTTTTTTTTC CTGCT
hsa-miR-3940-3p	F: AGCCCGGATCCCAG R: GGTCCAGTTTTTTTTTTTT TAAGTG	hsa-miR-5787	F: GGGCGCGGGGA R: GGTCCAGTTTTTTTTTTTT TTACCT
hsa-miR-4463	F: GCAGGAGACTGGGGTG R: GTCCAGTTTTTTTTTTTT TTGGC	hsa-miR-6735-3p	F: CTGTGGCTCCTCCCT R: GTCCAGTTTTTTTTTTTT TTCTGA
hsa-miR-4687-3p	F: GCAGTGGCTGTTGGAG R: CCAGTTTTTTTTTTTTTG CCTG	hsa-miR-6749-3p	F: GCTCCTCCCCTGCCT R: GTTTTTTTTTTTTTTCTG GCCA
hsa-miR-4726-3p	F: AGACCCAGGTCCCTCT R: GTTTTTTTTTTTTTTGCG CCA	hsa-miR-6756-5p	F: TGGGGCTGGAGGTG R: GGTCCAGTTTTTTTTTTTT TTAGC
hsa-miR-6741-3p	F: TCGGCTCTCTCCCTCA R: CCAGTTTTTTTTTTTTT TCTAGGGT	hsa-miR-6757-3p	F: GCAGAACTGGCCTTG R: CAGTTTTTTTTTTTTTTG GGATAG
hsa-miR-6807-3p	F: GCACTGCATTCTGCT R: GTTTTTTTTTTTTTTCTG GGCCA	hsa-miR-6763-3p	F: GCTCCCCGGCCTCT R: GGTCCAGTTTTTTTTTTTT TTCTG
hsa-miR-6846-5p	F: GGGCTGGATGGGGTAG R: GGTCCAGTTTTTTTTTTTT TTACTC	hsa-miR-6777-3p	F: CGCAGTCCACTCTCCTG R: GGTCCAGTTTTTTTTTTTT TTCTG
hsa-miR-1296-5p	F: GGCCCTGGCTCCAT R: GTCCAGTTTTTTTTTTTT GGAGA	hsa-miR-6778-5p	F: GAGTGGGAGGACAGGAG R: AGTCCAGTTTTTTTTTTTT TTTACC
hsa-miR-1914-5p	F: GCCCGGCCCACTT R: GGTCCAGTTTTTTTTTTTT TTTCAGA	hsa-miR-6786-5p	F: GGTGGGGCCGGAG R: GGTCCAGTTTTTTTTTTTT TTACG
hsa-miR-3085-3p	F: GCAGTCTGGCTGCTATG R: GGTCCAGTTTTTTTTTTTT TTGAG	hsa-miR-6829-3p	F: CAGTGCCTCCTCCGT R: GGTCCAGTTTTTTTTTTTT TTCTGA
hsa-miR-3180-5p	F: GCAGCTTCCAGACGCT R: GTCCAGTTTTTTTTTTTT TCGAC	hsa-miR-6836-5p	F: GGCCCTGGCGCA R: TCCAGTTTTTTTTTTTTTA TGCCT
hsa-miR-3934-5p	F: GTCAGGTGTGGAACTGAG R: GTCCAGTTTTTTTTTTTT TCTGC	hsa-miR-6851-5p	F: CAGAGGAGGTGGTACTAGG R: GGTCCAGTTTTTTTTTTTT TTTGCT
hsa-miR-4253	F: GCAGAGGGCATGTCCAG R: AGGTCCAGTTTTTTTTTTTT TTTACC	hsa-miR-7110-3p	F: TCTCTCTCCCACTTCCCT R: GGTCCAGTTTTTTTTTTTT TTTCTG

Окончание табл. 3

End of table 3

МикроРНК miRNA	Последовательность праймеров (5'→3') Primer sequence (5'→3')
hsa-miR-7113-3p	F: CTGCCCCGCTCTCT R: GGTCCAGTTTTTTTTTTT TTCTG
hsa-miR-7160-3p	F: CAGGGCCCTGGCT R: TCCAGTTTTTTTTTTT TCTGCT
hsa-miR-874-3p	F: CCTGGCCCGAGGGA R: GTCCAGTTTTTTTTTTT TTCGGT
hsa-miR-99a-3p	F: AAGCTCGCTTCTATGGGT R: GGTCCAGTTTTTTTTTTT TTTCAG
U6	F: CGGCAGCACATATACTAAAA TTGGAACGATACAGAGAAGATT AGCATGGCCCTGCGCAAGGA TGACACGCAAATTCGTGAAG R: CAGGTCCAGTTTTTTTTTTT TTTAA

Примечание. Последовательности основаны на зрелых микроРНК из miRDB.

Note. Sequences are based on mature miRNAs from miRDB.

miRNA-мишеней в образцах нормальной ткани последовательно по схеме, приведенной ниже:

1) нормализация по референсному локусу:

$$\Delta C(t) = C(t)_{\text{target}} - C(t)_{\text{reference}}$$

где $C(t)_{\text{reference}} - C(t)$ референсного локуса;

2) расчет $E^{-\Delta C(t)}$ и медианы $E^{-\Delta C(t)}$ по каждой miRNA для условно нормальной и опухолевой тканей каждого пациента;

3) нормализация по условно нормальной ткани и определение окончательного результата как кратность изменений по формуле:

$$FC = RE = E^{-\Delta C(t) \text{ медиана опухолевой ткани}} / E^{-\Delta C(t) \text{ медиана нормальной ткани}}$$

(что тождественно $E^{-\Delta \Delta C(t)}$,

или $E^{-(\Delta C(t) \text{ медиана опухолевой ткани} - \Delta C(t) \text{ медиана нормальной ткани})}$ [20].

Экспрессию lncRNA оценивали с использованием метода ПЦР, аналогичного примененному для анализа экспрессии мРНК. С помощью алгоритма для нормализации данных экспрессии выбран ген lncRNA *LINC00115* ($M\text{-value} = 0,096$; $S\text{-value} = 2,343$) (табл. 4).

Методы статистической обработки полученных данных. Статистическую обработку результатов выполняли с помощью программы Statistica 10.0 (StatSoft, США). Нормальность распределения показателей оценивали с использованием критерия Колмогорова–Смирнова. Для анализа различий применяли критерий Манна–Уитни для порогового уровня статистической значимости $p < 0,05$; для учета множественного сравнения — поправку Бонферрони. Связь между пе-

ременными оценивали с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Биоинформатический анализ. С использованием GEO2R проанализирована дифференциальная экспрессия генов в 400 образцах тканей (300 опухолевых и 100 нормальных) больных РЖ. Обнаружены 18 617 дифференциально экспрессирующихся локусов, включая кодирующие белки гены, miRNAs и lncRNAs. Из них 9061 генетический локус статистически значимо снижал экспрессию, а 9556 локусов были гиперэкспрессированы (рис. 1).

Из ДЭГ особый интерес представляет группа так называемых РТ-генов. Так, в ходе анализа базы данных GEO выявлено изменение экспрессии 11 РТ-генов: *MAGEA10*, *MAGEA2*, *MAGEA12*, *MAGEA3*, *MAGEA6*, *MAGEH1*, *MAGEE1*, *BAGE2*, *CTAGE5*, *MAGED2* и *MAGEL2* (табл. 5).

Для локусов *MAGEA10*, *MAGEA2*, *MAGEA12*, *MAGEA3*, *MAGEA6*, *MAGEH1*, изменивших экспрессию более чем в 1,25 раза, проведен поиск таргетирующих их miRNAs. Выявлены 789 уникальных miRNAs: 270 для *MAGEA10*, 93 — для *MAGEA12*, 98 — для *MAGEA2*, 84 — для *MAGEA3*, 109 — для *MAGEA6* и 135 — для *MAGEH1*. Наиболее стабильным взаимодействием с целевой мРНК (оценивалось по свободной энергии взаимодействия, не более $-26,0$) обладала 201 miRNA: 73 — для *MAGEA10*, 27 — для *MAGEA12*, 20 — для *MAGEA2*, 31 — для *MAGEA3*, 33 — для *MAGEA6* и 17 — для *MAGEH1*.

Среди выявленных 40 miRNAs таргетируют несколько рассматриваемых локусов (рис. 2, табл. 6). Для 4 из них установлена возможность взаимодействия с 90 lncRNAs. При этом ncRNA *KCNQ1OT1* способна взаимодействовать с 3 miRNAs (hsa-miR-3940-3p, -1296-5p и -874-3p), *AC109460.3* и *AC131212.3* — с 2 miRNAs (hsa-miR-3940-3p и hsa-miR-874-3p), *MIR29B2CHG* и *XIST* — с 2 miRNAs (hsa-miR-6807-3p и hsa-miR-1296-5p), *NEAT1* и *SNHG29* — с 2 miRNAs (hsa-miR-6807-3p и hsa-miR-874-3p) (рис. 3).

Для оценки потенциала направленной деградации miRNA под действием lncRNA используют TDMDScore. По этому показателю финальный список lncRNAs был следующим: для hsa-miR-3940-3p — *KCNQ1OT1*, *LINC01089* и *AC145285.6*, для hsa-miR-6807-3p — *GAS5*, *AC005034.3*, *AC104447.1*, *AL691447.2* и *AC024580.1*, для hsa-miR-1296-5p — *AL355075.4*, *AC069281.2*, *SNHG14* и *SNHG15*, для hsa-miR-874-3p — *AC040162.3*, *MIRLET7BHG*, *AC002101.1*, *SLC9A3-AS1* и *AL118506.1*.

Экспериментальная валидация данных биоинформатического анализа. На основе данных биоинформатического анализа выбран фрагмент потенциально существующей регуляторной сети конкурентно взаимодействующих РНК для валидации на образцах 100 пациентов со злокачественными опухолями желудка.

Таблица 4. Последовательности праймеров для определения экспрессии длинных некодирующих РНК (дизайн *de novo*)**Table 4.** Primer sequences for determining the expression of long non-coding RNAs (*de novo* design)

Ген Gene	Последовательность праймеров (5'→3') Primer sequence (5'→3')	Длина ампликона (п. н.) Amplicon length (bp)
<i>KCNQ10T1</i>	F: GTCTGCTGGCTTGTGTGTTG R: GGCTACGACCACAGGTGAAA	106
<i>LINC01089</i>	F: AGAGGCCAACAGATGAGGGA R: GTTGGGTAGGCAAAAAGGCG	98
<i>AC145285.6</i>	F: GCCTGCAGTGTGCTAGAGTA R: GTTTCCCCTCCTGTGTGCTC	146
<i>GAS5</i>	F: AAGCCCCTGGAGGAAAGTCT R: CCCTTTAGCCAGTTCCTCCTC	76
<i>AC005034.3</i>	F: TACTCCACCATGTTGCTCAAGT R: CATCGGCACATAGGAGCCTTC	198
<i>SNHG14</i>	F: TGAAGCTCAGGCCTTTCTCTG R: ATACCGGTCAATGCCAAGTG	91
<i>SNHG15</i>	F: GGCAGTCTAGTCATCCACCG R: AGGAACTGGCAGCTAACACG	106
<i>SLC9A3-AS1</i>	F: GCGGGGATCTGGGGTTTCTC R: TCCGAAGGCTGACTAGCCG	148
<i>MIRLET7BHG</i>	F: GTCCAGACGAGCAGACACTG R: GGACGGGGCCACATTTATCT	129
<i>AL118506.1</i>	F: TGATGGGTGCACAAAGGGTT R: ATCATGGGTGGGAAAGCTGG	115
<i>LINC00115</i>	F: CCTGTAACAACCCTCGTGCT R: ATCCACAGCGAGGCAATGAA	132

Примечание. Праймеры подобраны на основе базы данных NCBI и программы Primer-BLAST, использован *de novo* дизайн с валидацией *in silico*.

Note. Primers were selected on public databases (NCBI and program Primer-BLAST), *de novo* design with *in silico* validation was used.

В этот фрагмент вошли 6 РТ-генов (*MAGEA10*, *MAGEA2*, *MAGEA12*, *MAGEA3*, *MAGEA6*, *MAGEH1*), 40 miRNAs (hsa-miR-1207-5p, -5006-3p, -6848-5p, -6858-5p, -3127-3p, -3940-3p, -4463, -4687-3p, -4726-3p, -6741-3p, -6807-3p, -6846-5p, -1296-5p, -1914-5p, -3085-3p, -3180-5p, -3934-5p, -4253, -4313, -4488, -4530, -4687-5p, -4695-5p, -5787, -6735-3p, -6749-3p, -6756-5p, -6757-3p, -6763-3p, -6777-3p, -6778-5p, -6786-5p, -6829-3p, -6836-5p, -6851-5p, -7110-3p, -7113-3p, -7160-3p, -874-3p и -99a-3p) и 17 lncRNAs (*KCNQ10T1*, *LINC01089*, *AC145285.6*, *GAS5*, *AC005034.3*, *AC104447.1*, *AL691447.2*, *AC024580.1*, *AL355075.4*, *AC069281.2*, *SNHG14*, *SNHG15*, *AC040162.3*, *MIRLET7BHG*, *AC002101.1*, *SLC9A3-AS1*, *AL118506.1*).

На рис. 4 представлены результаты анализа экспрессии 6 РТ-генов (*MAGEA10*, *MAGEA2*, *MAGEA12*, *MAGEA3*, *MAGEA6* и *MAGEH1*).

Обнаружено статистически значимое увеличение экспрессии генов *MAGEA10*, *MAGEA3* и *MAGEA6* в 2,74; 2,54 и 3,57 раза соответственно в опухолевой ткани относительно нормальной ($p < 0,0001$).

С учетом того, что изменение экспрессии выявлено только для 3 генетических локусов, панель для валидации miRNA была сокращена до 32 miRNAs, таргетирующих эти локусы (рис. 5).

Обнаружено статистически значимое снижение уровней экспрессии hsa-miR-1207-5p (в 1,72 раза), -6858-5p (в 2,7 раза), -3127-3p (в 1,96 раза), -3940-3p (в 7,14 раза), -6807-3p (в 4,76 раза), -3085-3p (в 1,75 раза), -3934-5p (в 2,86 раза), -4488 (в 3,45 раза), -4530 (в 2,04 раза), -6777-3p (в 1,82 раза), -99a-3p (в 2,33 раза) ($p < 0,0001$), а также статистически значимое повышение уровней экспрессии hsa-miR-7113-3p (в 1,78 раза) и hsa-miR-874-3p (в 2,04 раза) в опухолевой ткани относительно нормальной ткани ($p < 0,0001$) (см. рис. 5).

Для 4 miRNAs установлено взаимодействие с 17 lncRNAs с высоким индексом TDMDScore. Результаты анализа экспрессии 17 lncRNAs представлены на рис. 6.

В опухолевой ткани обнаружено статистически значимое повышение уровней экспрессии *LINC01089* (в 3,72 раза), *AC145285.6* (в 2,14 раза), *GAS5* (в 1,95 раза),

Таблица 5. Дифференциально экспрессирующиеся гены раково-тестикулярных антигенов при раке желудка (результаты биоинформатического анализа)**Table 5.** Differentially expressed cancer-testicular antigen genes in gastric cancer (results of bioinformatics analysis)

Ген Gene	Полное название гена Full name of the gene	FC, раз FC, times	logFC	p-value
<i>MAGEA10</i>	Член семейства генов <i>MAGE A10</i> <i>MAGE family member A10</i>	1,339*	0,421	0,00000000053700
<i>MAGEA2</i>	Член семейства генов <i>MAGE A2</i> <i>MAGE family member A2</i>	1,444*	0,530	0,00000000015300
<i>MAGEA12</i>	Член семейства генов <i>MAGE A12</i> <i>MAGE family member A12</i>	1,503*	0,589	0,00000000012700
<i>MAGEA3</i>	Член семейства генов <i>MAGE A3</i> <i>MAGE family member A3</i>	1,751*	0,808	0,00000000000513
<i>MAGEA6</i>	Член семейства генов <i>MAGE A6</i> <i>MAGE family member A6</i>	1,765*	0,819	0,00000000000316
<i>MAGEH1</i>	Член семейства генов <i>MAGE H1</i> <i>MAGE family member H1</i>	0,794 (1,259)*	−0,332	0,00000000000000
<i>MAGEE1</i>	Член семейства генов <i>MAGE E1</i> <i>MAGE family member E1</i>	0,838 (1,193)** (x = 0,838)	−0,255	0,00000000000000
<i>BAGE2</i>	Член семейства антигенов меланомы B2 B melanoma antigen family member 2	0,935 (1,069)**	−0,096	0,00001050000000
<i>CTAGE5</i>	Член семейства генов <i>CTAGE 5</i> <i>CTAGE family member 5</i>	0,946 (1,057)**	−0,080	0,00068700000000
<i>MAGED2</i>	Член семейства генов <i>MAGE D2</i> <i>MAGE family member D2</i>	0,954 (1,048)**	−0,068	0,00007640000000
<i>MAGEL2</i>	Член семейства генов <i>MAGE L2</i> <i>MAGE family member L2</i>	0,977 (1,023)**	−0,033	0,01590000000000

*Изменение экспрессии более чем в 1,25 раза. **Отношение 1/x, где x — значение перед скобками.

Примечание. FC — кратность изменений; logFC — логарифмическое значение FC.

*Expression change more than 1.25 times fold change. **Ratio 1/x, where x is the value before the parentheses.

Note. FC — fold change; logFC — logarithmic value of FC.

AC005034.3 (в 2,24 раза) и *AL691447.2* (в 3,18 раза) ($p < 0,001$), а также статистически значимое снижение уровней экспрессии *SNHG14* (в 1,85 раза), *AC002101.1* (в 3,70 раза), *SLC9A3-AS1* (в 2,04 раза) и *AL118506.1* (в 9,09 раза) ($p < 0,001$) относительно нормальной ткани (см. рис. 6).

На основании полученных данных построена модель регуляторной сети для РТ-генов при РЖ (рис. 7).

Согласно модели увеличение уровня экспрессии lncRNAs отрицательно коррелирует со снижением уровня экспрессии miRNAs ($r = -0,678...-0,851$), что в свою очередь отрицательно коррелирует с уменьшением экспрессии РТ-генов ($r = -0,584...-0,912$). Важно отметить, что снижение уровня экспрессии lncRNAs *AC002101.1*, *SLC9A3-AS1* и *AL118506.1* отрицательно коррелирует с повышением уровня экспрессии hsa-miR-7113-3p и hsa-miR-874-3p ($r = -0,678...-0,851$), а их экспрессия положительно коррелирует ($r = 0,590-0,916$) с увеличением экспрессии РТ-генов *MAGEA3*

и *MAGEA6*. Экспрессия *MAGEH1* в опухолевой ткани была такой же, как и в нормальной ткани, экспрессия таргетирующей *MAGEH1* hsa-miR-874-3p повышена ($r = -0,087$), экспрессия hsa-miR-1296-5p не изменена ($r = 0,119$) (рис. 7).

ОБСУЖДЕНИЕ

В экспериментальной части проведенного исследования проанализирована экспрессия 6 РТ-генов в опухолевой и нормальной тканях у 100 пациентов с аденокарциномой желудка. Однако статистически значимые различия в уровнях экспрессии в опухолевой и нормальной тканях выявлены только для 3 генов — *MAGEA10*, *MAGEA3* и *MAGEA6*: наблюдалось значительное повышение их экспрессии.

Семейство генов *MAGE* человека (хромосома Xq28, 12 генов) кодирует ядерные белки, большинство которых экспрессируются в опухолевых клетках. В нормальных клетках они либо не экспрессируются, либо

Fig. 1. Results of bioinformatics analysis of differentially expressed genes in gastric cancer: *a* – boxplot (generated using Boxplot in R used for visualization of sample distributions); *b* – results of Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) method for dimension reduction and visualization of sample associations (the plot shows the number of nearest neighbors used in calculations; generated using UMAP)

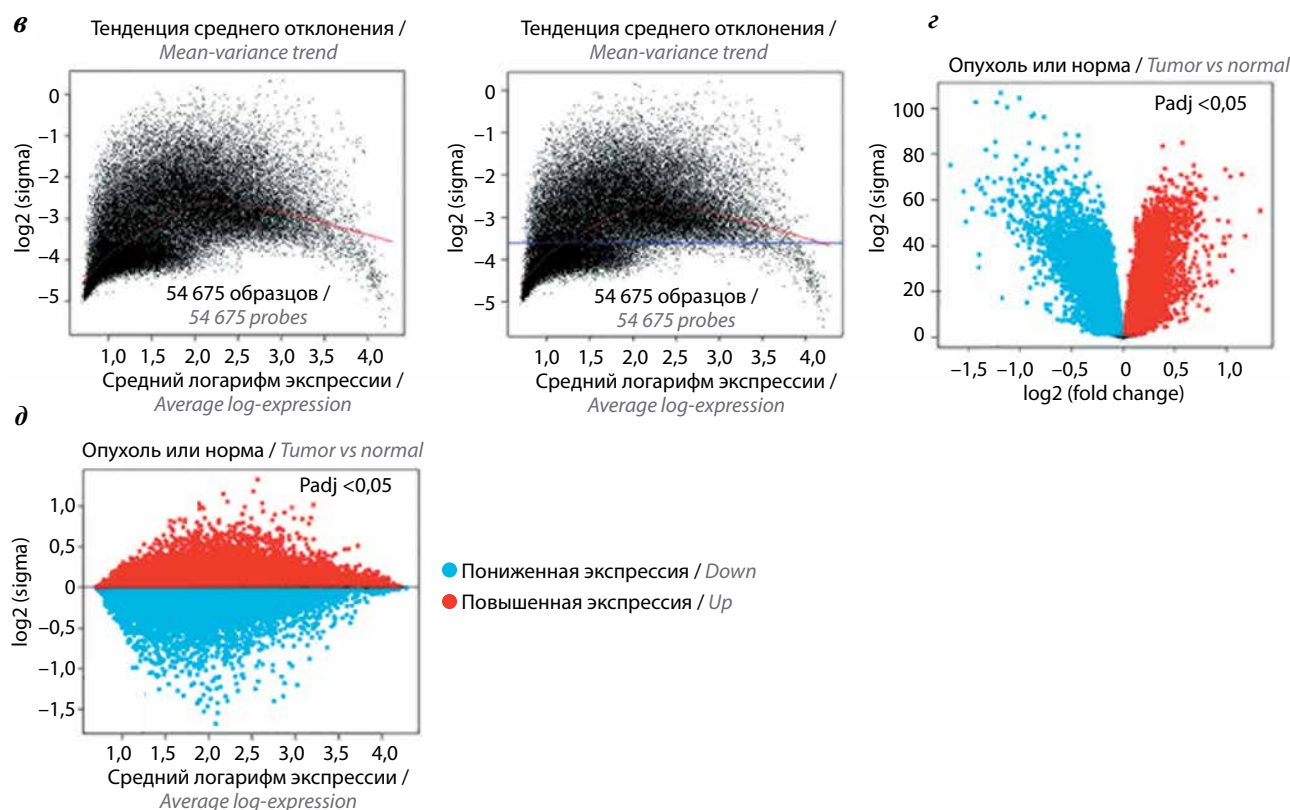


Рис. 1. (Окончание). **в** – тенденция среднего отклонения (сгенерировано с использованием R limma (plotSA, vooma)); **г** – вулканограмма (сгенерировано с использованием limma), отображающая статистическую значимость (значение $-\log_{10}P$) в зависимости от величины логарифмического кратного изменения; **д** – график средней разности (MD), отображающий логарифмическое изменение по сравнению со средними значениями экспрессии log2 (сгенерировано с использованием limma (plotMD))

Fig. 1. (End). **в** – mean variance trend (generated using R limma (plotSA, vooma)); **г** – volcano plot (generated using limma) showing statistical significance (value $-\log_{10}P$) depending on the value of logarithmic fold change; **д** – mean difference (MD) plot showing logarithmic change compared to mean values of log2 expression (generated using limma (plotMD))

	MAGEA12 (n = 27)	MAGEA2 (n = 20)	MAGEA3 (n = 31)	MAGEA6 (n = 33)	MAGEH1 (n = 17)
MAGEA10 (n = 73)	5 (0,0526)	2 (0,0220)	3 (0,0297)	5 (0,0495)	2 (0,0227)
MAGEA12 (n = 27)		11 (0,3056)	8 (0,1600)	9 (0,1765)	0 (0,0000)
MAGEA2 (n = 20)			7 (0,1591)	6 (0,1277)	0 (0,0000)
MAGEA3 (n = 31)				15 (0,3061)	1 (0,0213)
MAGEA6 (n = 33)					2 (0,0417)

0 Индекс Жаккара / Jaccard index 1

Рис. 2. Парные пересечения по микроРНК разных генов-мишеней раково-тестикулярных антигенов. Приведены число совпадений и индекс Жаккара (в скобках)

Fig. 2. Paired intersections of microRNAs of different cancer-testicular antigen target genes. Number of matches and Jaccard index (in brackets) are presented

экспрессируются в минимальной степени, за исключением зародышевых клеток яичек и плаценты [24, 25]. Поскольку зародышевые клетки лишены поверхностных молекул HLA класса I, предполагается, что ответы специфических цитотоксических Т-лимфоцитов CD8⁺ (CTL) на антигены, кодируемые генами *MAGE*, строго опухолеспецифичны при разных видах рака, иными словами, они являются раковыми антигенами [26]. Молекулы *MAGE* в раковых клетках могут подвергаться протеасомно-опосредованному протеолизу, а раз-

рушенные пептиды — транспортироваться на поверхность клетки с помощью белка, связывающего антиген. Эти эпитопы могут быть представлены HLA-аллелями цитотоксических Т-лимфоцитов (клетки CD8⁺-CTL), а активированные CTL затем способны высвободить гранзимы и перфорины, чтобы убить соответствующие опухолевые клетки посредством апоптоза или действия гранулизына [27]. Благодаря своим характеристикам это семейство генов в последние годы представляет большой интерес для разработки противо-

Таблица 6. Общие микроРНК для разных генов-мишеней раково-тестикулярных антигенов

Table 6. Common microRNAs for different cancer-testicular antigen target genes

МикроРНК miRNA	Количество таргетируемых локусов Number of target loci	Гены, с матричными РНК которых взаимодействуют микроРНК Genes whose mRNAs interact with miRNAs
hsa-miR-1207-5p	4	<i>MAGEA10, MAGEA12, MAGEA2, MAGEA6</i>
hsa-miR-5006-3p	4	<i>MAGEA12, MAGEA2, MAGEA3, MAGEA6</i>
hsa-miR-6848-5p	4	<i>MAGEA12, MAGEA2, MAGEA3, MAGEA6</i>
hsa-miR-6858-5p	4	<i>MAGEA10, MAGEA12, MAGEA3, MAGEA6</i>
hsa-miR-3127-3p	3	<i>MAGEA2, MAGEA3, MAGEA6</i>
hsa-miR-3940-3p	3	<i>MAGEA12, MAGEA3, MAGEA6</i>
hsa-miR-4463	3	<i>MAGEA10, MAGEA12, MAGEA6</i>
hsa-miR-4687-3p	3	<i>MAGEA2, MAGEA3, MAGEA6</i>
hsa-miR-4726-3p	3	<i>MAGEA2, MAGEA3, MAGEA6</i>
hsa-miR-6741-3p	3	<i>MAGEA12, MAGEA2, MAGEA3</i>
hsa-miR-6807-3p	3	<i>MAGEA10, MAGEA12, MAGEA3</i>
hsa-miR-6846-5p	3	<i>MAGEA10, MAGEA12, MAGEA2</i>
hsa-miR-1296-5p	2	<i>MAGEA6, MAGEH1</i>
hsa-miR-1914-5p	2	<i>MAGEA12, MAGEA3</i>
hsa-miR-3085-3p	2	<i>MAGEA12, MAGEA6</i>
hsa-miR-3180-5p	2	<i>MAGEA12, MAGEA2</i>
hsa-miR-3934-5p	2	<i>MAGEA3, MAGEA6</i>
hsa-miR-4253	2	<i>MAGEA3, MAGEA6</i>
hsa-miR-4313	2	<i>MAGEA10, MAGEA6</i>
hsa-miR-4488	2	<i>MAGEA3, MAGEA6</i>
hsa-miR-4530	2	<i>MAGEA3, MAGEA6</i>
hsa-miR-4687-5p	2	<i>MAGEA12, MAGEA2</i>
hsa-miR-4695-5p	2	<i>MAGEA10, MAGEA6</i>
hsa-miR-5787	2	<i>MAGEA12, MAGEA2</i>
hsa-miR-6735-3p	2	<i>MAGEA6, MAGEH1</i>
hsa-miR-6749-3p	2	<i>MAGEA10, MAGEH1</i>
hsa-miR-6756-5p	2	<i>MAGEA12, MAGEA2</i>
hsa-miR-6757-3p	2	<i>MAGEA12, MAGEA3</i>
hsa-miR-6763-3p	2	<i>MAGEA10, MAGEH1</i>
hsa-miR-6777-3p	2	<i>MAGEA10, MAGEA3</i>
hsa-miR-6778-5p	2	<i>MAGEA3, MAGEA6</i>
hsa-miR-6786-5p	2	<i>MAGEA12, MAGEA2</i>
hsa-miR-6829-3p	2	<i>MAGEA12, MAGEA2</i>
hsa-miR-6836-5p	2	<i>MAGEA12, MAGEA6</i>
hsa-miR-6851-5p	2	<i>MAGEA3, MAGEA6</i>
hsa-miR-7110-3p	2	<i>MAGEA12, MAGEA6</i>
hsa-miR-7113-3p	2	<i>MAGEA3, MAGEA6</i>
hsa-miR-7160-3p	2	<i>MAGEA2, MAGEA3</i>
hsa-miR-874-3p	2	<i>MAGEA3, MAGEH1</i>
hsa-miR-99a-3p	2	<i>MAGEA3, MAGEA6</i>

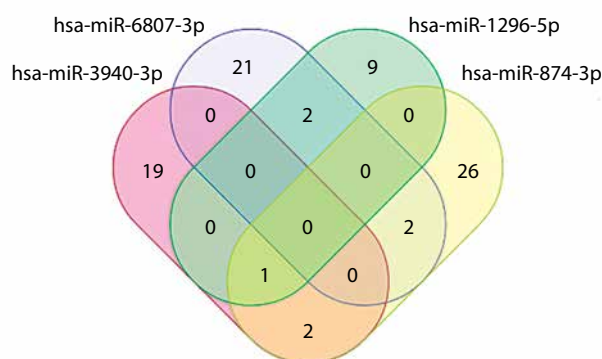


Рис. 3. Общие длинные некодирующие РНК для 4 микроРНК

Fig. 3. Common long non-coding RNAs for 4 microRNAs

раковых препаратов и иммунотерапии [28]. В настоящее время механизмы участия генов семейства *MAGE* при многих заболеваниях, таких как меланома, рак пищевода, РЖ, неясны [29].

MAGEA10 (CT1.10, *MAGE10*, *MGC10599*) является членом семейства генов *MAGEA*. Этот РТ-ген представляет собой привлекательную мишень для иммунотерапии рака [30]. Высокий уровень экспрессии *MAGEA10* наблюдается у больных немелкоклеточным раком легкого [27]. Информация о молекулярной структуре белка и его взаимодействиях, экспрессии гена *MAGEA10* в различных опухолях, визуализация и локализация его экспрессии представлены на рис. 8, созданном на основе данных The Human Protein Atlas [31]. Продemonстрировано, что *MAGEA10* значительно

экспрессирован в опухолевой ткани желудка (что соответствует нашим данным), легкого, кожи, мозга, мочевого пузыря, предстательной железы и др. Высокий уровень экспрессии этого РТ-гена в различных опухолях может свидетельствовать как о схожих молекулярных механизмах, регулирующих его экспрессию, так и о том, что этот показатель можно использовать в качестве маркера онкологического процесса и универсальной мишени для иммунотерапии.

Еще одним членом семейства *MAGE* является меланома-ассоциированный антиген 3 (*MAGEA3*). Функция *MAGEA3* в нормальных клетках неизвестна. Присутствие антигена на опухолевых клетках связано с худшим прогнозом. Так, высокий уровень экспрессии *MAGEA3* при аденокарциноме ассоциирован с более низкими показателями выживаемости пациентов [32]. *MAGEA3* – опухолеспецифический белок, который обнаружен во многих опухолях, включая меланому, немелкоклеточный рак легкого, гематологические злокачественные новообразования и рак молочной железы [7]. Пептиды *MAGEA3* рассматриваются как наиболее привлекательные эпитопы; вакцины, содержащие эти пептиды, находятся на стадии разработки [33]. С 2008 г. GlaxoSmithKline создает вакцину против рака, нацеленную на *MAGEA3* [34].

Результаты исследования X. Gao и соавт., посвященного определению роли *MAGEA3* при раке шейки матки, показали, что его сверхэкспрессия значительно способствует пролиферации клеток *in vitro* и *in vivo*, увеличивает долю клеток в S-фазе клеточного цикла и подавляет апоптоз. Кроме того, обнаружено,

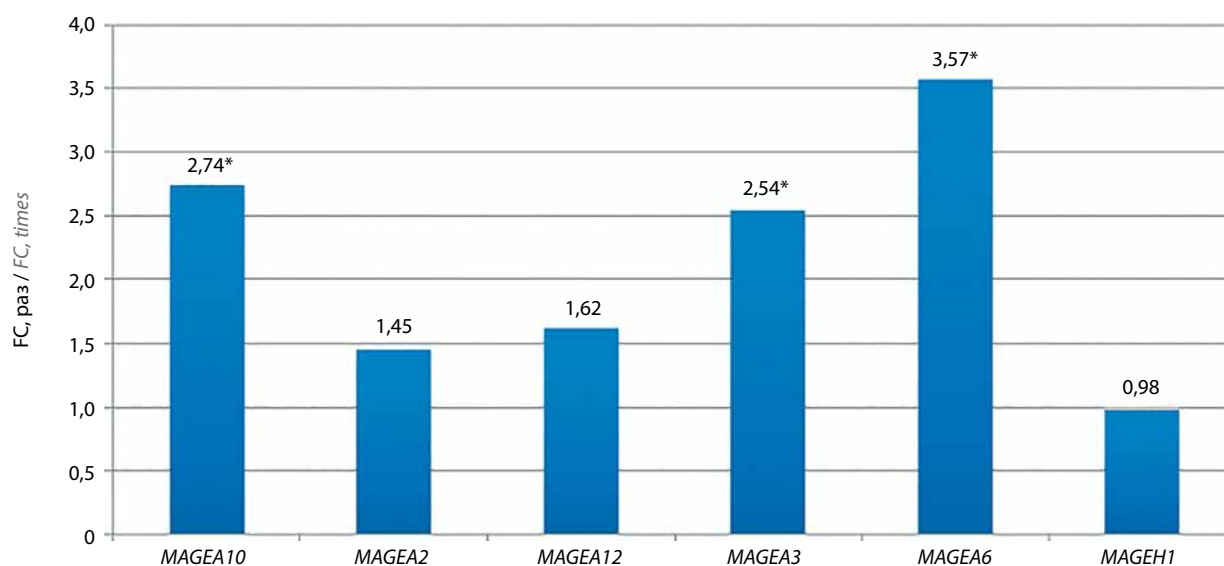


Рис. 4. Изменение уровней экспрессии генов раково-тестикулярных антигенов *MAGEA10*, *MAGEA2*, *MAGEA12*, *MAGEA3*, *MAGEA6* и *MAGEH1* в опухолевой ткани желудка относительно нормальной ткани (представлены отношение уровня экспрессии в опухолевой ткани к уровню экспрессии в нормальной ткани, кратность изменений (FC)). *Различия между опухолевыми и нормальными образцами ткани статистически значимы ($p < 0.0001$)

Fig. 4. Changes in expression levels of cancer/testis antigen genes *MAGEA10*, *MAGEA2*, *MAGEA12*, *MAGEA3*, *MAGEA6* and *MAGEH1* in gastric tumor tissue compared to normal tissue (ratio between expression in tumor tissue and expression in normal tissue, fold change (FC) are presented). *Differences between tumor and normal samples are statistically significant ($p < 0.0001$)

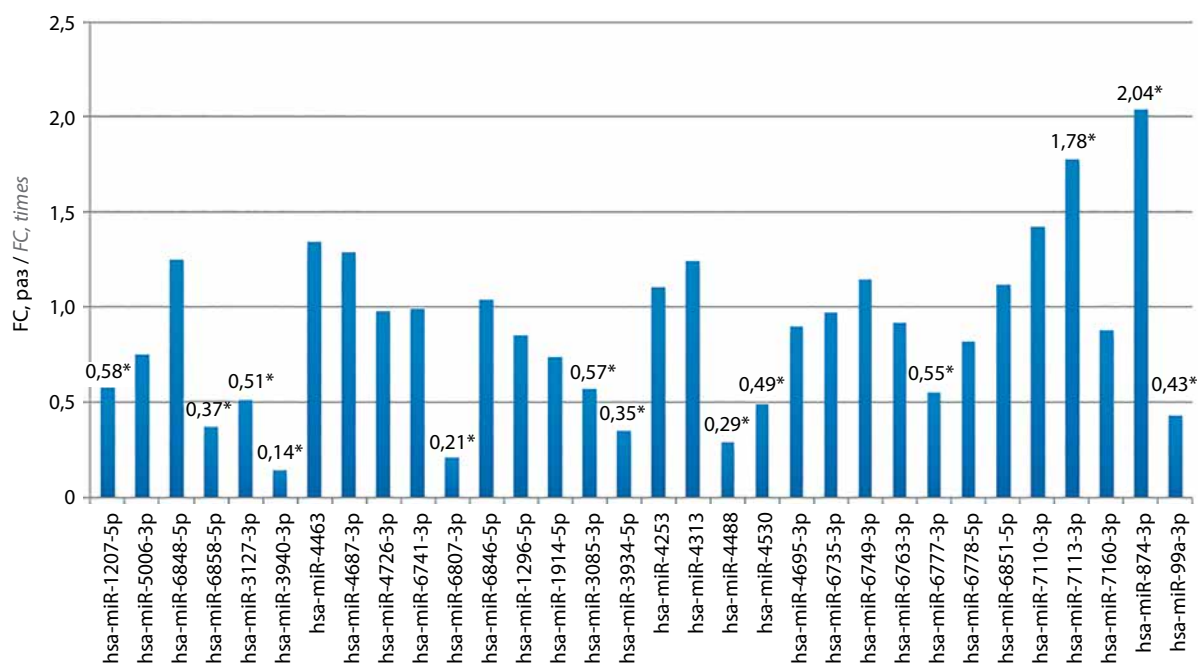


Рис. 5. Изменение уровней экспрессии 32 микроРНК, таргетирующих гены раково-тестикулярных антигенов MAGEA10, MAGEA3 и MAGEA6, в опухолевой ткани желудка относительно нормальной ткани (представлены отношение уровня экспрессии в опухолевой ткани к уровню экспрессии в нормальной ткани, кратность изменений (FC)). *Различия между опухолевыми и нормальными образцами ткани статистически значимы ($p < 0,0001$)

Fig. 5. Changes in expression of 32 microRNAs targeting genes of cancer/testis antigens MAGEA10, MAGEA3 and MAGEA6 in gastric tumor tissue compared to normal tissue (ratio between expression in tumor tissue and expression in normal tissue, fold change (FC) are presented). *Differences between tumor and normal samples are statistically significant ($p < 0.0001$)

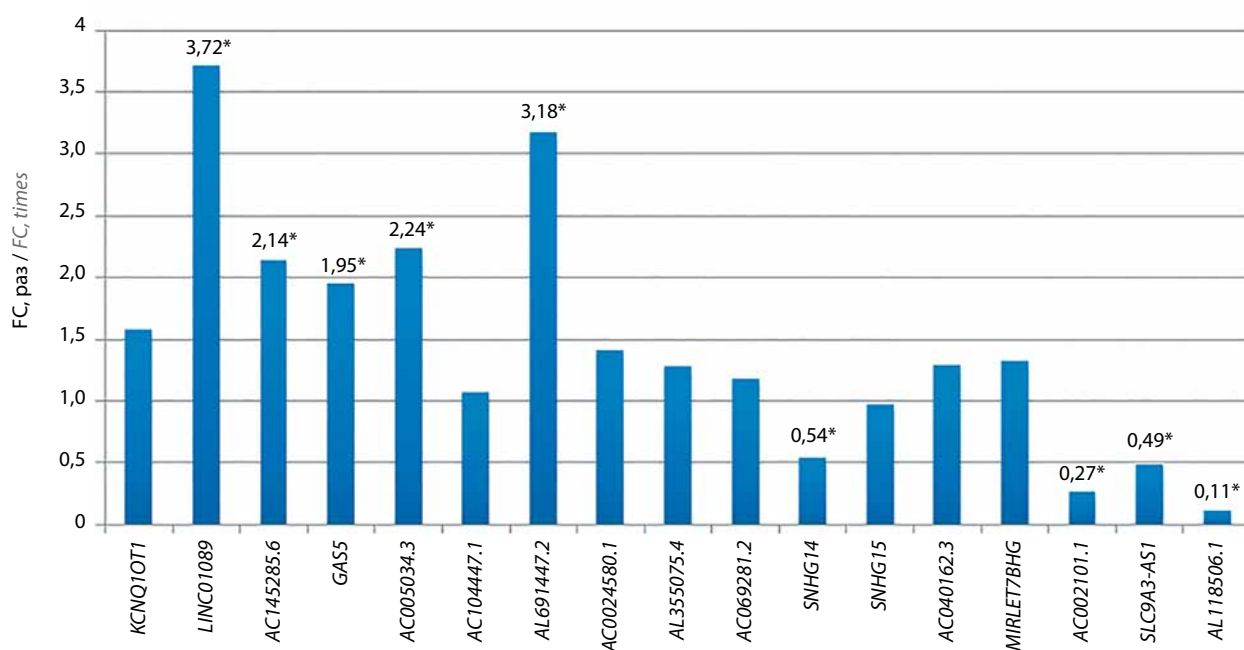


Рис. 6. Изменение уровней экспрессии 17 длинных некодирующих РНК, взаимодействующих с микроРНК hsa-miR-3940-3p, -6807-3p, -1296-5p и -874-3p, в опухолевой ткани желудка относительно нормальной ткани (представлены отношение уровня экспрессии в опухолевой ткани к уровню экспрессии нормальной ткани, кратность изменений (FC)). *Различия между опухолевыми и нормальными образцами ткани статистически значимы ($p < 0,0001$)

Fig. 6. Changes in expression of 17 long non-coding RNAs interacting with microRNAs hsa-miR-3940-3p, -6807-3p, -1296-5p and -874-3p in gastric tumor tissue compared to normal tissue (ratio between expression in tumor tissue and expression in normal tissue, fold change (FC) are presented). *Differences between tumor and normal samples are statistically significant ($p < 0.0001$)

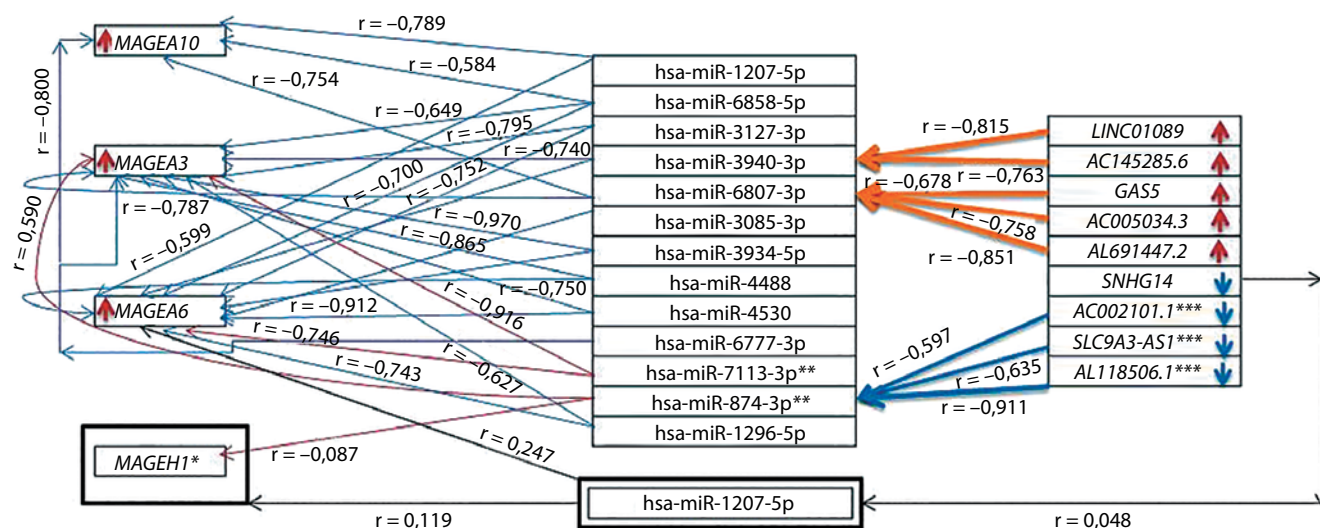


Рис. 7. Модель регуляторной сети для генов раково-тестикулярных антигенов при раке желудка. *Экспрессия такая же, как в нормальной ткани. **Экспрессия микроРНК выше, чем в нормальной ткани. ***Экспрессия длинной некодирующей РНК ниже, чем в нормальной ткани
Fig. 7. Model of cancer-testicular antigen genes regulatory network in gastric cancer. *Same expression as in normal tissue. **microRNA expression is higher than in normal tissue. ***Expression of long non-coding RNA is lower than in normal tissue

что снижение уровня экспрессии *MAGEA3* подавляет пролиферацию клеток HeLa, блокирует прогрессирование клеточного цикла в фазе G1 и вызывает апоптоз клеток. Результаты исследования механизма действия *MAGEA3* на клеточный цикл продемонстрировали, что *MAGEA3* взаимодействует с белком, связанным с доменом KRAB (KAP1), для ингибирования транскрипционной активности p53, что ингибирует экспрессию генов, ассоциированных с клеточным циклом, который опосредован p53 (p21 и Cyclin D1) и апоптозом (Bax, Bcl-2 и компонентом связывания Bcl-2).

Приведенные данные свидетельствуют о том, что *MAGEA3* способствует пролиферации клеток рака шейки матки и росту опухоли, играет онкогенную роль и регулирует сигнальный путь KAP1/p53 [35].

На рис. 9 представлена информация об экспрессии *MAGEA3* в различных опухолях (по данным проекта «Атлас ракового генома» (The Cancer Genome Atlas, TCGA)). Также как и в случае с *MAGEA10*, экспрессия *MAGEA3* повышается в различных опухолях.

Меланома-ассоциированный антиген A6 (*MAGEA6*) обладает онкогенной активностью, но механизмы, с помощью которых он регулирует прогрессию опухоли и химиорезистентность, неизвестны [36]. Все члены семейства *MAGE* кодируют белки, которые имеют сильное сходство друг с другом. Например, *MAGEA6* и *MAGEA3* характеризуются самой высокой гомологией (98 %). При этом в тканях рака шейки матки наблюдается отрицательная корреляция экспрессии *MAGEA6* и *MAGEA3* с клинической стадией [35]. Но эти 2 представителя семейства *MAGE*, тем не менее, могут служить биомаркерами для прогнозирования *in situ* ранних предраковых поражений [29]. В нашем исследовании

уровень экспрессии гена *MAGEA6* был в 1,4 раза выше уровня экспрессии *MAGEA3*; различия статистически незначимы.

MAGEA6 экспрессируется и в ряде других опухолей человека, таких как глиома и рак пищевода. Показано, что этот ген гиперэкспрессирован при раке молочной железы и связан с устойчивостью к терапии, поскольку подавление его экспрессии повышает химиочувствительность к доксорубину *in vitro* и *in vivo*. Нокдаун *MAGEA6* снижает убиквитинирование AMPK α 1, что повышает концентрацию AMPK α 1 и p-AMPK α в клетках рака молочной железы. Данные, полученные Н. Zhu и соавт., свидетельствуют о том, что воздействие на *MAGEA6* может повысить химиочувствительность при раке молочной железы посредством активации аутофагии и ферроптоза (AMPK α 1-зависимая аутофагия и AMPK α 1/SLC7A11-индуцированный ферроптоз) [37].

Очевидно, что влияние *MAGEA6* на аутофагию обеспечивает потенциальный механизм его онкогенных эффектов. Так, в исследовании Y.H. Tsang и G.B. Mills впервые изучена роль *MAGEA6* в регуляции аутофагии при аденокарциноме протоков поджелудочной железы. В соответствии со способностью этого гена ингибировать аутофагию при других типах рака экспрессия дикого типа *MAGEA6* в моделях клеток рака поджелудочной железы уменьшает базальную сигнализацию аутофагии, на что указывает снижение фосфорилирования AMPK и повышение фосфорилирования RPS6KB/S6K [38].

Сверхэкспрессия *MAGEA6* достаточна для трансформации незлокачественных эпителиальных клеток поджелудочной железы человека и индуцирует рост ксенотрансплантированной опухоли *in vivo*, вероятно,

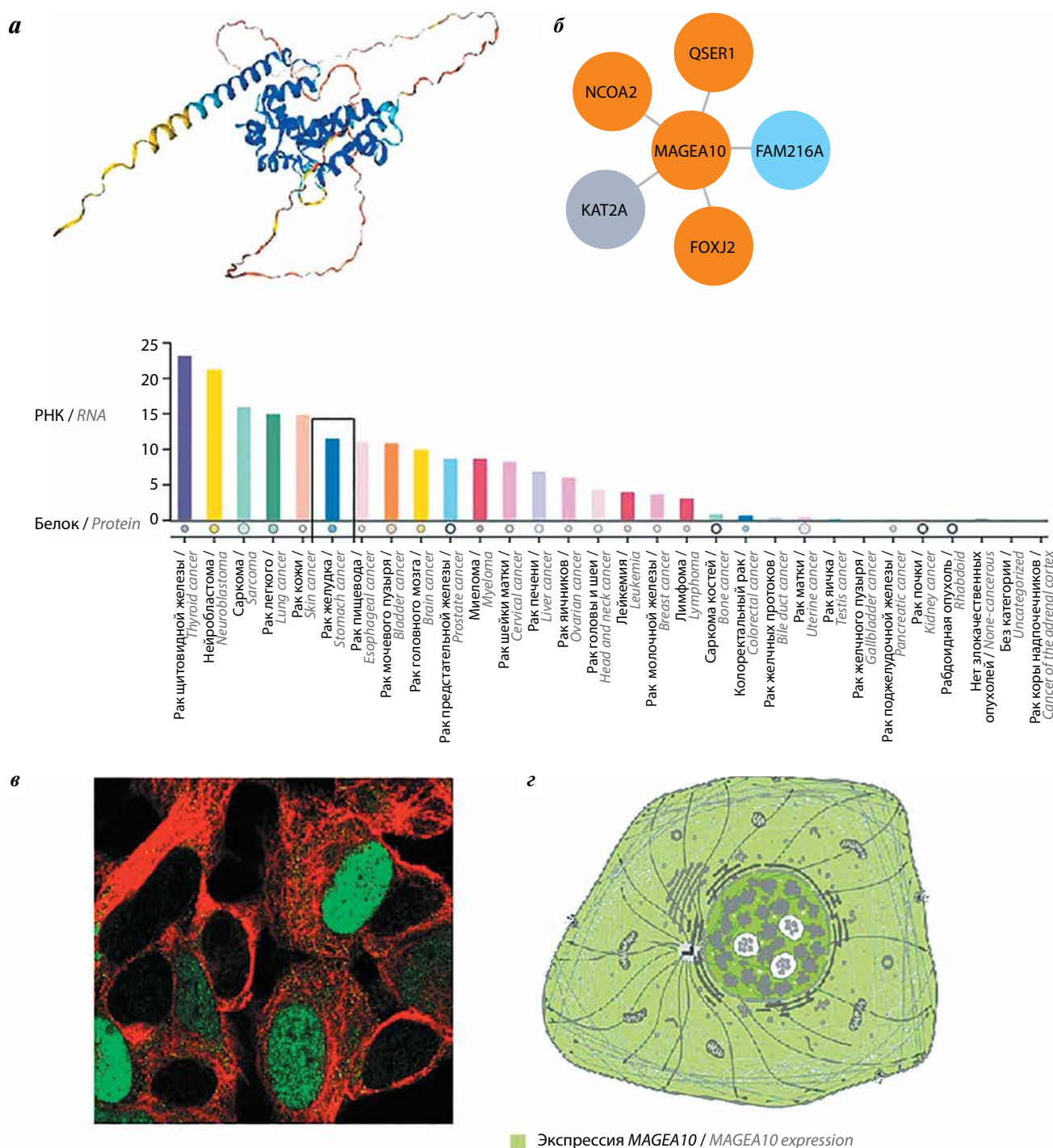


Рис. 8. Молекулярная структура белка MAGEA10 и его взаимодействия (а), экспрессия гена MAGEA10 в различных опухолях (б), визуализация (в) и локализация его экспрессии (г) (по данным Human Protein Atlas; <https://www.proteinatlas.org/>). nTPM – количество транскриптов на миллион

Fig. 8. Molecular structure of MAGEA10 protein and its interactions (a), expression of MAGEA10 gene in different tumors (б), visualization (в) and location of its expression (г) (per Human Protein Atlas; <https://www.proteinatlas.org/>). nTPM – transcripts per million

вызванный способностью *MAGEA6* ограничивать аутофагию. Данные, полученные Y.H. Tsang и G.B. Mills, свидетельствуют о том, что *MAGEA6* действует как координатор аутофагии, обеспечивая переход от низкого уровня активности аутофагии к высокому во время инициации и прогрессии опухоли. Высокая экспрессия *MAGEA6* играет большую роль в инициации забо-

левания, когда низкая активность аутофагии является допустимой, тогда как во время прогрессирования заболевания *MAGEA6* деградирует из-за спонтанных мутаций в гене и метаболического стресса, что приводит к высокой активности аутофагии. В соответствии с этой концепцией высокий уровень экспрессии *MAGEA6* ассоциируется только с худшими показателя-

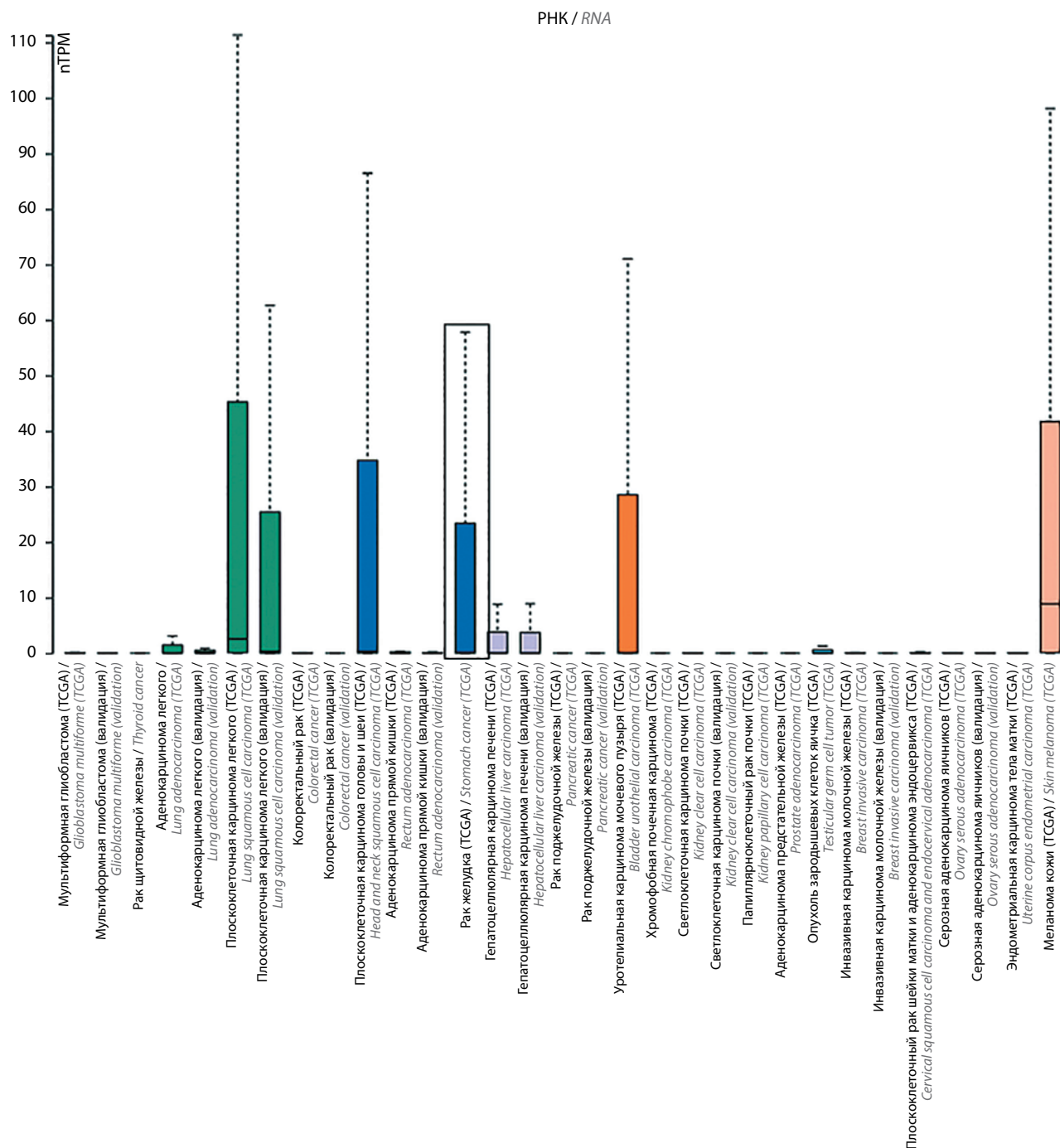


Рис. 9. Экспрессия *MAGEA3* в различных опухолях (по данным проекта «Атлас ракового генома» (The Cancer Genome Atlas, TCGA)). nTPM — количество транскриптов на миллион

Fig. 9. *MAGEA3* expression in different tumors (according to the project The Cancer Genome Atlas, TCGA). nTPM — transcripts per million

ми выживаемости [38]. Эти результаты могут помочь в разработке иммунотерапевтических стратегий воздействия на антигены *MAGEA* при злокачественных новообразованиях и позволяют понять роль *MAGEA6* в процессе возникновения и прогрессирования рака поджелудочной железы [39].

S.A. Shukla и соавт. выявили отрицательную связь между активаторами аутофагии и экспрессией белков *MAGEA* при меланоме [40]. *MAGEA3* и *MAGEA6* по-

давливали аутофагию в моделях рака легкого и колоректального рака [41].

Также *MAGEA6* опосредует выживание клеток глиомы человека, воздействуя на 5'AMP-активируемую протеинкиназу (AMPK) $\alpha 1$. Результаты исследования С.Т. Pineda и Р.Р. Potts показали, что комплекс *MAGEA6/KAP1* представляет собой раковоспецифическую убиквитинлигазу, которая разрушает AMPK $\alpha 1$ в клетках глиомы человека и раковых клетках желудка.

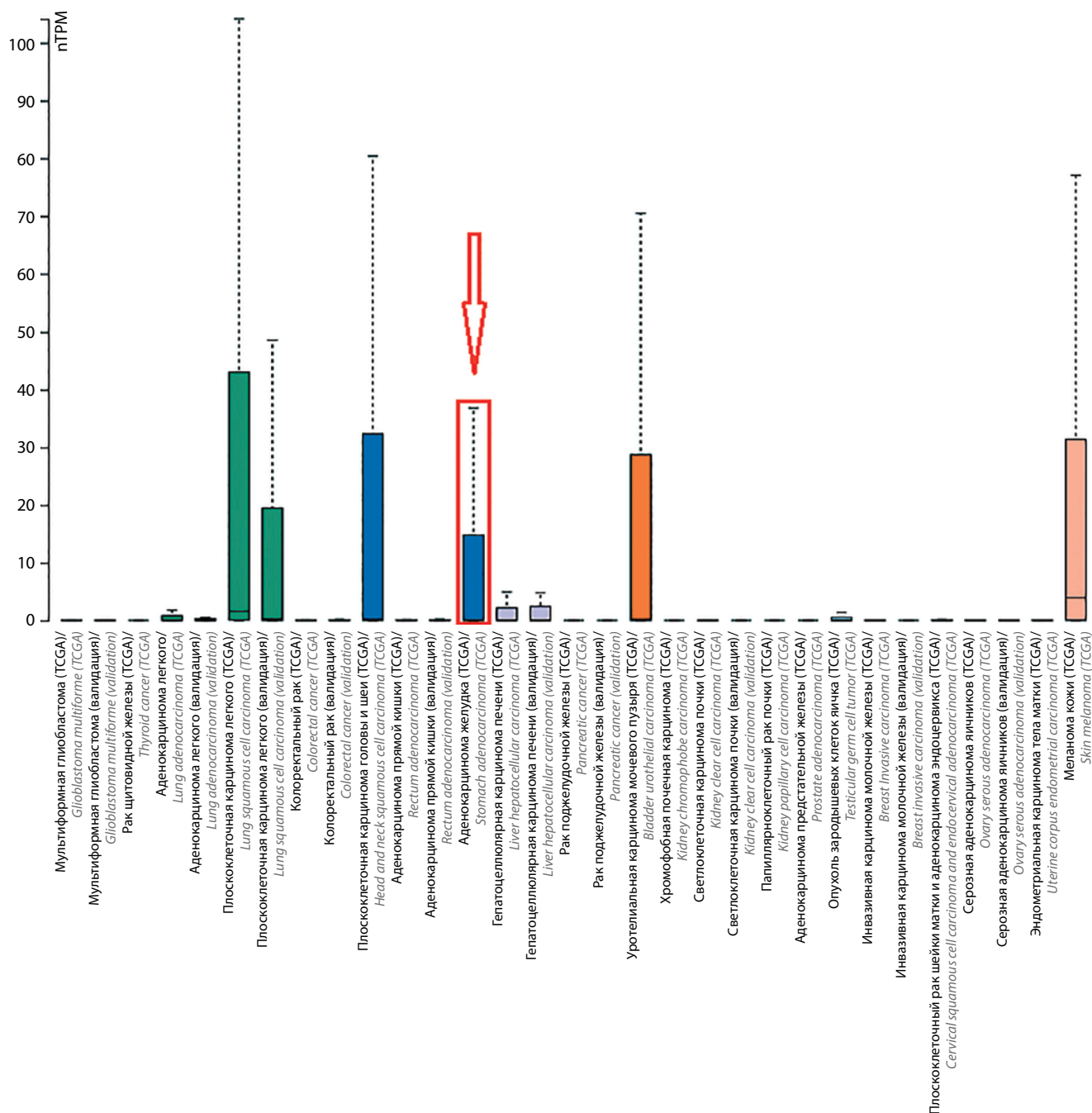


Рис. 10. Экспрессия *MAGEA6* в различных опухолях (по данным проекта «Атлас ракового генома» (The Cancer Genome Atlas, TCGA)). nTPM — количество транскриптов на миллион

Fig. 10. *MAGEA6* expression in different tumors (according to the project The Cancer Genome Atlas, TCGA). nTPM — transcripts per million

Кроме того, подавление экспрессии *MAGEA6* останавливало рост опухолей, трансплантированных мышам с тяжелым комбинированным иммунодефицитом, и пролиферацию первичных клеток глиомы человека *in vivo* [42].

В исследовании S.A. Shukla и соавт. оценивался уровень экспрессии *MAGEA6* в клетках плоскоклеточного рака пищевода и тканях аденокарциномы пищевода. Полученные данные показали, что *MAGEA6* высоко экспрессируется при развитии плоскоклеточного

рака пищевода и, следовательно, может служить новым биомаркером для диагностики или лечения данной патологии [40]. По данным других авторов, совместная экспрессия РТ-антигенов *MAGE-A6* и *MAGE-A11* при раке мочевого пузыря связана с агрессивностью опухоли [43].

Хотя повышенные уровни экспрессии *MAGEA6* обнаружены в различных типах опухолей, по-прежнему недостаточно информации о функции этого гена и связанных с ним сигнальных путях регуляции генов.

Так, изучено влияние *MAGEA6* на инвазию, миграцию и пролиферацию клеток. Секвенирование транскриптома было проведено на клеточной линии Hsa109, которая обычно экспрессировала *MAGEA6*. Выявлено, что высокая экспрессия данного гена оказывает значительное стимулирующее влияние на пролиферацию клеток, а также существенно усиливает инвазию и миграцию клеток. Результаты транскриптомного анализа показали, что 14 ДЭГ и 13 основных регуляторных генов тесно связаны с экспрессией *MAGEA6*, например ген метилстеролмонооксигеназы 1 (*MSMO1*). При этом *MAGEA6* положительно регулировал экспрессию *MSMO1*, которая играет большую онкогенную роль в клетках [28].

Особенности экспрессии *MAGEA6* в различных опухолях на основании данных проекта TCGA представлены на рис. 10.

Согласно данным литературы и результатам нашего исследования, важным механизмом регуляции экспрессии РТ-генов может быть изменение экспрессии miRNAs и lncRNAs. С помощью биоинформатических подходов выявлена сложная сеть потенциальных взаимодействий РТ-генов *MAGEA10*, *MAGEA2*, *MAGEA12*, *MAGEA3*, *MAGEA6* и *MAGEH1* с 789 уникальными miRNAs.

МикроРНК — это короткие некодирующие РНК, эпигенетически регулирующие экспрессию генов путем взаимодействия с комплементарными нуклеотидными последовательностями мРНК-мишеней, приводящего к их деградации и ингибированию трансляции в белки [44]. Они вносят значительный вклад в инициацию и развитие различных молекулярных событий, включая инициацию онкогенеза, прогрессирование и метастазирование [45].

Экспериментально нами подтверждено изменение экспрессии в опухолевой ткани желудка 13 miRNAs, таргетирующих мРНК *MAGEA10*, *MAGEA3* и *MAGEA6*: уровни транскриптов hsa-miR-1207-5p, -6858-5p, -3127-3p, -3940-3p, -6807-3p, -3085-3p, -3934-5p, -4488, -4530, -6777-3p, -99a-3p были понижены, а hsa-miR-7113-3p и hsa-miR-874-3p — повышены. Снижение уровней экспрессии hsa-miR-1207-5p, -6858-5p, -3127-3p, -3940-3p, -6807-3p, -3085-3p, -3934-5p, -4488, -4530, -6777-3p и hsa-miR-99a-3p, очевидно, препятствует деградации мРНК РТ-генов, обеспечивая высокий уровень их экспрессии.

Схожий механизм регуляции показан Д.С. Кутиным для колоректального рака: регуляция экспрессии РТ-генов в опухолях толстой кишки реализуется с помощью разных молекулярных механизмов, включающих изменения в экспрессии hsa-miR-143-3p, -26a-5p, -25-3p, -92a-3p, -21-5p и hsa-let-7i-5p [20].

МикроРНК могут взаимодействовать с lncRNAs, что, в свою очередь, также обеспечивает регуляцию экспрессии генов-мишеней. Длинные некодирующие РНК (lncRNAs) — это РНК размером более 200 нуклеотидов, регулирующие биологическую активность

клеток различными способами, включая транскрипционную, посттранскрипционную регуляцию и регуляцию трансляции. Они могут контролировать посттранскрипционную регуляцию, являясь компонентом сети ceRNAs и выступая в качестве молекулярной губки (сорбента) miRNAs [44, 46].

Так, в нашем исследовании с помощью методов биоинформатики выявлено взаимодействие hsa-miR-3940-3p с *KCNQ1OT1*, *LINC01089* и *AC145285.6*, hsa-miR-6807-3p — с *GAS5*, *AC005034.3*, *AC104447.1*, *AL691447.2* и *AC024580.1*, hsa-miR-1296-5p — с *AL355075.4*, *AC069281.2*, *SNHG14* и *SNHG15*, hsa-miR-874-3p — с *AC040162.3*, *MIRLET7BHG*, *AC002101.1*, *SLC9A3-AS1* и *AL118506.1*. Экспериментально подтверждено увеличение экспрессии *LINC01089*, *AC145285.6*, *GAS5*, *AC005034.3* и *AL691447.2*, а также снижение экспрессии *SNHG14*, *AC002101.1*, *SLC9A3-AS1* и *AL118506.1* в опухолевой ткани относительно нормальной.

Таким образом, собрана необходимая информация по всем компонентам регуляторной сети конкурентно-взаимодействующих эндогенных РНК, включая lncRNAs, miRNAs и мРНК.

Комплексный анализ представленных выше данных позволил нам разработать модель регуляторной сети для РТ-генов при РЖ (см. рис. 7). Увеличение представленности транскриптов lncRNAs *LINC01089*, *AC145285.6*, *GAS5*, *AC005034.3* и *AL691447.2* приводит к повышению эффективности взаимодействия lncRNAs и miRNAs (hsa-miR-3940-3p и hsa-miR-6807-3p). Образование комплекса lncRNA—miRNA приводит к уменьшению количества свободных miRNAs и их взаимодействия с генами-мишенями (*MAGEA3*, *MAGEA6*, *MAGEA10*). Противоположный эффект наблюдается при снижении представленности транскриптов lncRNAs *SNHG14*, *AC002101.1*, *SLC9A3-AS1* и *AL118506.1*, что вызывает снижение эффективности взаимодействия lncRNAs и таргетирующих их miRNAs (hsa-miR-1296-5p и hsa-miR-874-3p). Нарушение образования комплекса lncRNA—miRNA приводит к увеличению количества свободной miRNA hsa-miR-874-3p и ее эффективному взаимодействию с генами-мишенями (*MAGEH1* и *MAGEA3*). При этом представленность транскриптов *MAGEH1* не изменяется, а *MAGEA3*, вероятно, в большей степени регулируется другими miRNAs.

Представленная модель включает лишь фрагмент регуляторной системы РТ-генов при РЖ, а именно сети конкурентно-взаимодействующих РНК. Необходимо учитывать и другие механизмы регуляции, такие как изменение копийности генов и их метилирование, которые уже описаны в наших работах [17, 20] и которым будут посвящены дальнейшие исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования выявлено нарушение в сети конкурентно-взаимодействующих РНК РТ-генов при аденокарциноме желудка, выражающееся в измене-

нии транскрипционной активности генов *MAGEA10*, *MAGEA3* и *MAGEA6*, miRNAs hsa-miR-1207-5p, -6858-5p, -3127-3p, -3940-3p, -6807-3p, -3085-3p, -3934-5p, -4488, -4530, -6777-3p, -99a-3p, -7113-3p и -874-3p, а также lncRNAs *LINC01089*, *AC145285.6*, *GAS5*, *AC005034.3*, *AL691447.2* *SNHG14*, *AC002101.1* и *SLC9A3-AS1* в опухо-

левой ткани. Полученные данные имеют большое значение для понимания фундаментальных механизмов регуляции РТ-генов и совершенствования подходов к иммунотерапии (новые мишени и регуляторные молекулы) и диагностике (новые молекулярные маркеры) РЖ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Ilic M., Ilic I. Epidemiology of stomach cancer. *World J Gastroenterol* 2022;28(12):1187–203. DOI: 10.3748/wjg.v28.i12.1187
- Sun H., Wang Y., Wang S. et al. The involvement of collagen family genes in tumor enlargement of gastric cancer. *Sci Rep* 2023;13(1):100. DOI: 10.1038/s41598-022-25061-0
- Oue N., Hamai Y., Mitani Y. et al. Gene expression profile of gastric carcinoma: identification of genes and tags potentially involved in invasion, metastasis, and carcinogenesis by serial analysis of gene expression. *Cancer Res* 2004;64(7):2397–405. DOI: 10.1158/0008-5472.can-03-3514
- Li L., Zhu Z., Zhao Y. et al. FN1, SPARC, and SERPINE1 are highly expressed and significantly related to a poor prognosis of gastric adenocarcinoma revealed by microarray and bioinformatics. *Sci Rep* 2019;9(1):7827. DOI: 10.1038/s41598-019-43924-x
- Takahashi Y., Fukuyama T., Futawatari N. et al. Expression of kita-kyushu lung cancer antigen-1 as detected by a novel monoclonal antibody in gastric cancer. *Anticancer Res* 2019;39(11):6259–63. DOI: 10.21873/anticancer.13835
- Кутилин Д.С., Могушкова Х.А. Влияние противоопухолевых антибиотиков антрациклинового ряда на транскрипционную активность раково-тестикулярных антигенов в модельном эксперименте на клеточной линии HeLa. *Медицинская иммунология* 2019;21(3):539–46. Kutilin D.S., Mogushkova Kh.A. Effect of anthracycline antitumor antibiotics upon transcription activity of cancer-testis antigens in model experiments with HeLa cells. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology* 2019;21(3):539–46. (In Russ.).
- Водолажский Д.И., Кутилин Д.С., Могушкова Х.А., Кит О.И. Транскрипционный профиль раковотестикулярных антигенов у больных раком молочной железы. *Медицинская иммунология* 2018;20(3):383–90. DOI: 10.15789/1563-0625-2018-3-383-390 Vodolazhskiy D.I., Kutilin D.S., Mogushkova Kh.A., Kit O.I. Transcriptional profile of cancer-testicular antigens in patients with breast cancer. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology* 2018;20(3):383–90. (In Russ.). DOI: 10.15789/1563-0625-2018-3-383-390
- Кутилин Д.С., Кит О.И. Зависимость выживаемости и метастазирования у больных колоректальным раком от транскрипционной активности РТ-генов. *Сибирский онкологический журнал* 2022;21(1):37–46. DOI: 10.21294/1814-4861-2022-21-1-37-46 Kutilin D.S., Kit O.I. Relationship between the transcriptional activity of CT-genes and survival in colorectal cancer patients. *Sibirskiy onkologicheskii zhurnal = Siberian Journal of Oncology* 2022;21(1):37–46. (In Russ.). DOI: 10.21294/1814-4861-2022-21-1-37-46
- Futawatari N., Fukuyama T., Yamamura R. et al. Early gastric cancer frequently has high expression of KK-LC-1, a cancer-testis antigen. *World J Gastroenterol* 2017;23(46):8200–6. DOI: 10.3748/wjg.v23.i46.8200
- Chen Y., Panarelli N., Piotti K., Yantiss R. Cancer-testis antigen expression in digestive tract carcinomas: frequent expression in esophageal squamous cell carcinoma and its precursor lesions. *Cancer Immunol Res* 2013;2(5):480–6. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0124
- Guo L., Song C., Wang P. et al. Competing endogenous RNA networks and gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2015;21(41):11680–7. DOI: 10.3748/wjg.v21.i41.11680
- Wu H.J., Dai W.-W., Wang L.-B. et al. Comprehensive analysis of the molecular mechanism for gastric cancer based on competitive endogenous RNA network. *World J Traditional Chinese Med* 2023;9(1):29–42. DOI: 10.4103/2311-8571.355010
- Кит О.И., Енгибарян М.А., Гварамия А.К. и др. Генетические и эпигенетические предикторы чувствительности плоскоклеточного рака языка к препаратам платины. *Вестник Российской академии медицинских наук* 2024;79(6):490–506. DOI: 10.15690/vramn2337 Kit O.I., Engibaryan M.A., Gvaramiya A.K. et al. Genetic and epigenetic predictors of tongue squamous cell carcinoma sensitivity to platinum drugs. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences* 2024;79(6):490–506. (In Russ.). DOI: 10.15690/vramn2337
- Love M.I., Huber W., Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 2014;15(12):550. DOI: 10.1186/s13059-014-0550-8
- Davis S., Meltzer P.S. GEOquery: a bridge between the Gene Expression Omnibus (GEO) and BioConductor. *Bioinformatics* 2007;23(14):1846–7. DOI: 10.1093/bioinformatics/btm254
- Kutilin D.S., Gusareva M.A., Kosheleva N.G., Kit O.I. Regulatory network of competitively interacting RNAs and effectiveness of rectal tumors radiotherapy. *Klin Onkol* 2022;35(4):297–306. DOI: 10.48095/ccko2022297
- Кит О.И., Водолажский Д.И., Кутилин Д.С., Гудуева Е.Н. Изменение копийности генетических локусов при раке желудка. *Молекулярная биология* 2015;49(4):658–66. DOI: 10.7868/S0026898415040096 Kit O.I., Vodolazhsky D.I., Kutilin D.S., Gudueva E.N. Changes in the number of copies of genetic loci in gastric cancer. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology* 2015;49(4):658–66. (In Russ.). DOI: 10.7868/S0026898415040096
- Кутилин Д.С., Димитриади С.Н., Водолажский Д.И. и др. Влияние тепловой ишемии-реперфузии на экспрессию апоптоз-регулирующих генов в почечной ткани больных с почечно-клеточным раком. *Нефрология* 2017;21(1):80–6. DOI: 10.24884/1561-6274-2017-21-1-80-86 Kutilin D.S., Dimitriadi S.N., Vodolazhsky D.I. et al. The effect of thermal ischemia-reperfusion on the expression of apoptosis-regulating genes in the renal tissue of patients with renal cell carcinoma. *Nefrologiya = Nephrology* 2017;21(1):80–6. (In Russ.). DOI: 10.24884/1561-6274-2017-21-1-80-86
- Кутилин Д.С., Никитин И.С., Кит О.И. Особенности экспрессии генов некоторых транскрипционных факторов при малигнизации тканей тела матки. *Успехи*

- молекулярной онкологии 2019;6(1):57–62. DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-1-57-62
- Kutulin D.S., Nikitin I.S., Kit O.I. Features of some transcription factors gene expression in the malignancy tissues of the corpus uteri. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2019;6(1):57–62. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-1-57-62
20. Кутилин Д.С. Регуляция экспрессии генов раково-тестикулярных антигенов у больных колоректальным раком. Молекулярная биология 2020;54(4):580–95. DOI: 10.31857/S0026898420040096
Kutulin D.S. Regulation of gene expression of testicular cancer antigens in patients with colorectal cancer. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology* 2020;54(4):580–95 (In Russ.). DOI: 10.31857/S0026898420040096
 21. Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002;3(7):RESEARCH0034. DOI: 10.1186/gb-2002-3-7-research0034
 22. Balcells I., Cirera S., Busk P.K. Specific and sensitive quantitative RT-PCR of miRNAs with DNA primers. *BMC Biotechnology* 2011;11:70. DOI: 10.1186/1472-6750-11-70
 23. Peltier H.J., Latham G.J. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA* 2008;14(5):844–52. DOI: 10.1261/rna.939908
 24. Valmori D., Dutoit V., Rubio-Godoy V. et al. Frequent cytolytic T-cell responses to peptide MAGE-A10 (254–262) in melanoma. *Cancer Res* 2001;61(2):509–12.
 25. Gevorkyan Y.A., Kutulin D.S., Kit O.I. et al. Copy number variation and expression of CT-genes in patients with colorectal cancer. Available at: <https://www.asco.org/abstracts-presentations/ABSTRACT295213>
 26. Batchu R.B., Gruzdyn O., Potti R.B. et al. MAGE-A3 with cell-penetrating domain as an efficient therapeutic cancer vaccine. *Jama Surg* 2014;149(5):451–7. DOI: 10.1001/jamasurg.2013.4113
 27. Wang L., Xu Y., Luo C. et al. MAGEA10 gene expression in non-small cell lung cancer and A549 cells, and the affinity of epitopes with the complex of HLA-A(*)0201 alleles. *Cell Immunol* 2015;297(1):10–8. DOI: 10.1016/j.cellimm.2015.05.004
 28. Liu M., Li J., Wang Y. et al. MAGEA6 positively regulates MSMO1 and promotes the migration and invasion of oesophageal cancer cells. *Exp Ther Med* 2022;23(3):204. DOI: 10.3892/etm.2022.11127
 29. Kuldkepp A., Karakai M., Toomsoo E. et al. Cancer-testis antigens MAGEA proteins are incorporated into extracellular vesicles released by cells. *Oncotarget* 2019;10(38):3694–708. DOI: 10.18632/oncotarget.26979
 30. Kuldkepp A., Karakai M., Toomsoo E. et al. Cancer-testis antigens MAGEA proteins are incorporated into extracellular vesicles released by cells. *Oncotarget* 2019;10(38):3694–708. DOI: 10.18632/oncotarget.26979
 31. The Human Protein Atlas. Available at: <https://www.proteinatlas.org/>
 32. Decoster L., Wauters I., Vansteenkiste J.F. Vaccination therapy for non-small-cell lung cancer: review of agents in phase III development. *Ann Oncol* 2011;23(6):1387–93. DOI: 10.1093/annonc/mdr564
 33. Peled N., Oton A.B., Hirsch F.R., Bunn P. MAGE A3 antigen-specific cancer immunotherapeutic. *Immunotherapy* 2009;1(1):19–251. DOI: 10.2217/1750743X.1.1.19
 34. Use of MAGE A3-protein D fusion antigen in immunotherapy combined with surgery, chemotherapy or radiotherapy for the treatment of cancer. (Patent US20100008980 – 2008-01-08). Retrieved 2012-10-16.
 35. Gao X., Li Q., Chen G. et al. MAGEA3 promotes proliferation and suppresses apoptosis in cervical cancer cells by inhibiting the KAP1/p53 signaling pathway. *Am J Transl Res* 2020;12(7):3596–612.
 36. Pan S.J., Ren J., Jiang H. et al. MAGEA6 promotes human glioma cell survival via targeting AMPKα1. *Cancer Lett* 2018;412:21–9. DOI: 10.1016/j.canlet.2017.09.051
 37. Zhu H., Jiang Cw., Zhang Wl. et al. Targeting oncogenic MAGEA6 sensitizes triple negative breast cancer to doxorubicin through its autophagy and ferroptosis by stabilizing AMPKα1. *Cell Death Discov* 2024;10(1):430. DOI: 10.1038/s41420-024-02196-9
 38. Tsang Y.H., Mills G.B. The roles of MAGEA6 variants in pancreatic cancer development and their potential impact on cancer immunotherapy. *Autophagy* 2020;16(10):1923–4. DOI: 10.1080/15548627.2020.1802091
 39. Tsang Y.H., Wang Y., Kong K. et al. Differential expression of MAGEA6 toggles autophagy to promote pancreatic cancer progression. *Elife* 2020;9:e48963. DOI: 10.7554/eLife.48963
 40. Shukla S.A., Bachireddy P., Schilling B. et al. Cancer-germline antigen expression discriminates clinical outcome to CTLA-4 blockade. *Cell* 2018;173(3):624–33.e8. DOI: 10.1016/j.cell.2018.03.026
 41. Pineda C.T., Ramanathan S., Fon Tacer K. et al. Degradation of AMPK by a cancer-specific ubiquitin ligase. *Cell* 2015;160(4):715–28. DOI: 10.1016/j.cell.2015.01.034
 42. Pineda C.T., Potts P.R. Oncogenic MAGEA-TRIM28 ubiquitin ligase downregulates autophagy by ubiquitinating and degrading AMPK in cancer. *Autophagy* 2015;11(5):844–6. DOI: 10.1080/15548627.2015.1034420
 43. Mohsenzadegan M., Razmi M., Vafaei S. et al. Co-expression of cancer-testis antigens of MAGE-A6 and MAGE-A11 is associated with tumor aggressiveness in patients with bladder cancer. *Sci Rep* 2022;12(1):599. DOI: 10.1038/s41598-021-04510-2
 44. Кутилин Д.С., Гусарева М.А., Кошелева Н.Г. и др. Нарушения в регуляторной сети конкурентно-взаимодействующих РНК и радиорезистентность опухолей прямой кишки. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований* 2021;11:12–29. DOI: 10.17513/mjpf.13306
Kutulin D.S., Gusareva M.A., Kosheleva N.G. et al. Disorders in the regulatory network of competitively interacting RNAs and radioresistance of rectal tumors. *Mezhdunarodny zhurnal prikladnyh i fundamental'nyh issledovaniy = International Journal of Applied and Fundamental Research* 2021;11:12–29. (In Russ.). DOI: 10.17513/mjpf.13306
 45. Abdelsattar Z.M., Wong S.L., Regenbogen S.E. et al. Colorectal cancer outcomes and treatment patterns in patients too young for average-risk screening. *Cancer* 2016;122(6):929–34. DOI: 10.1002/cncr.29716
 46. Cao C., Zhang T., Zhang D. et al. The long noncoding RNA, SNHG6-003, functions as a competing endogenous RNA to promote the progression of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2017;36(8):1112. DOI: 10.1038/ncr.2016.278

Вклад авторов

Д.С. Кутилин: разработка концепции и дизайна исследования, написание текста статьи, биоинформатический анализ данных, выполнение ключевых этапов молекулярных исследований;

О.И. Кит: анализ клинических данных, написание текста статьи;

А.Ю. Максимов: анализ клинических и экспериментальных данных, редактирование;

Л.Х. Чалхакян: сбор клинических данных, получение биологического материала и его первичная обработка, статистический анализ экспериментальных данных;

А.В. Дашков: анализ клинических, экспериментальных данных и данных литературы, получение биологического материала и его первичная обработка;

С.А. Малинин, Г.В. Каминский: получение биологического материала, ведение базы данных пациентов, выделение нуклеиновых кислот из биологического материала;

Т.П. Шкурят: разработка концепции и дизайна исследования, редактирование.

Authors' contributions

D.S. Kutilin: development of the research concept and design, article writing, bioinformatic data analysis, implementation of key stages of molecular research;

O.I. Kit: analysis of clinical data, article writing;

A.Yu. Maksimov: analysis of clinical and experimental data, editing;

L.H. Chalkhakhyan: collection of clinical data, obtaining biological material and its primary processing, statistical analysis of experimental data;

A.V. Dashkov: analysis of clinical, experimental and literature data, obtaining biological material and its primary processing;

S.A. Malinin, G.V. Kaminsky: obtaining biological material, maintaining a patient database, isolating nucleic acids from biological material;

T.P. Shkurat: development of the research concept and design, editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

Д.С. Кутилин / D.S. Kutilin: <https://orcid.org/0000-0002-8942-3733>

О.И. Кит / O.I. Kit: <https://orcid.org/0000-0003-3061-6108>

А.Ю. Максимов / A.Yu. Maksimov: <https://orcid.org/0000-0002-9471-3903>

А.В. Дашков / A.V. Dashkov: <https://orcid.org/0000-0002-3867-4532>

С.А. Малинин / S.A. Malinin: <https://orcid.org/0000-0002-1220-7143>

Т.П. Шкурят / T.P. Shkurat: <https://orcid.org/0000-0001-6197-7374>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки в рамках исследовательского проекта Д.С. Кутилина «Молекулярные особенности спорадических форм злокачественных новообразований: фундаментальные и прикладные аспекты».

Funding. The work was performed without external funding within the framework of D.S. Kutilin's research project "Molecular features of sporadic forms of malignant neoplasms: fundamental and applied aspects".

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Национальный медицинский центр онкологии» Минздрава России (протокол № 5 от 14.02.2014).

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (protocol No. 5 dated 14.02.2014).