

<sup>1</sup>Національний інститут раку, Київ<sup>2</sup>Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

# ПРОГНОЗУВАННЯ ПЕРЕБІГУ РАКУ ГРУДНОЇ ЗАЛОЗИ ШЛЯХОМ ВИЗНАЧЕННЯ ГЕНА ІНТЕРСЕКТИНУ *ITSN2*



Л.А. Сивак<sup>1</sup>, І.А. Крячок<sup>1</sup>,  
Г.О. Губарева<sup>1</sup>, С.А. Лялькін<sup>1</sup>,  
Н.М. Майданевич<sup>1</sup>, А.В. Аскольський<sup>1</sup>,  
С.В. Кропивко<sup>2</sup>, О.В. Криклива<sup>2</sup>,  
О.В. Новохацька<sup>2</sup>, Л.О. Циба<sup>2</sup>,  
А.В. Риндич<sup>2</sup>

Адреса:

Сивак Любов Андріївна  
03022, Київ, вул. Ломоносова, 33/43  
Національний інститут раку  
E-mail: lasyvak@gmail.com

**Ключові слова:** рак грудної залози, ген інтерсектин *ITSN2*, хіміотерапія.

**З урахуванням клінічної та генетичної гетерогенності раку грудної залози на сьогодні однією з основних проблем є прогнозування перебігу захворювання. Виявлення складних мереж білкових взаємодій, вивчення особливостей експресії гена в зразках пухлини і розвиток технологій профілювання експресії генів *ITSN2* можуть бути незалежним прогностичним фактором відсутності рецидивів захворювання.**

Однією з основних проблем на шляху до прогресу в діагностиці та лікуванні хворих на рак грудної залози (РГЗ) є висока клінічна і генетична гетерогенність цього захворювання. Значного удосконалення як у діагностиці, так і у вивченні перебігу РГЗ досягнуто за останні декілька років завдяки розвитку технологій профілювання експресії генів.

В експериментах з аналізу експресії генів за допомогою мікрочипів встановлено, що ген інтерсектину-2 (*ITSN2*) є одним з небагатьох генів, рівень експресії якого суттєво відрізняється у зразках пухлин хворих на РГЗ, у яких виникали рецидиви хвороби, та пацієнтів із РГЗ, що залишалися здоровими після радикального видалення пухлини та хіміотерапії (ХТ) з використанням схеми CMF (циклофосфамід, метотрексат і флуороурацил) [1]. Високий рівень експресії *ITSN2* корелював із відсутністю у хворих зі злоякісними пухлинами грудної залози (ЗПГЗ) віддалених метастазів протягом довгого періоду. Крім того, встановлено, що співвідношення експресії лише двох генів, *ITSN2* та *CXCL9*, може бути незалежним прогностичним фактором відсутності рецидивів хвороби.

*ITSN2* є представником родини інтерсектинів (*ITSN1* та *ITSN2*). Інтерсектини — білки, які функціонують як адаптори, збираючи білкові комплекси при клатрин-опосередкованому ендоцитозі, а також беруть участь у внутрішньоклітинній передачі сигналу та перебудовах актинового цитоскелета [2]. *ITSN2* має подібну до *ITSN1* доменну структуру.

Нещодавно описано, що ендоцитоз впливає на сигнальні шляхи, що призводять до проліферації клітин ссавців, а його порушення може спричиняти гіперпроліферацію та злоякісну трансформацію [3].

Гіперекспресія *ITSN1* була достатньою для злоякісної трансформації

фібробластів гризунів і призводила до активації кіназ JNK та ERK [4].

Водночас підвищений рівень експресії *ITSN2* у зразках тканин ЗПГЗ корелював з відсутністю рецидивів та сприятливим прогнозом. Це може свідчити про існування специфічних функцій обох інтерсектинів у клітинних процесах, пов'язаних із канцерогенезом, та вказує на необхідність їх визначення для з'ясування ролі інтерсектинів в ініціації та прогресуванні злоякісних захворювань.

Виявлення складних мереж білкових взаємодій *ITSN2* та вивчення особливостей експресії гена, що його кодує, в нормі та в зразках тканин ЗПГЗ дасть можливість розширити знання про участь адапторних білків у клітинних процесах, у ході розвитку пухлин та визначенні ролі *ITSN2* як прогностичного онкомаркера.

В останні роки з'явилися роботи, в яких показано існування пухлиноасційованих альтернативно-сплайсованих ізоформ білків і виявлено зв'язок між пошкодженням сайтів альтернативного сплайсингу та канцерогенезом.

Крім того, встановлено, що власне процес альтернативного сплайсингу, включно з його трансфакторами, може бути потенційною мішенню для генної терапії злоякісних новоутворень. Детальний аналіз експресії ізоформ *ITSN1* та *ITSN2* у тканинах пухлин не проводили.

Раніше виявлено до 17 подій альтернативного сплайсингу первинного транскрипту та вивчено експресію ізоформ *ITSN1* у нормі та при деяких патологічних станах. Відомо також про існування до 6 ізоформ *ITSN2*. На нашу думку, отримання та поєднання даних про експресію альтернативно-сплайсованих ізоформ *ITSN2* у різних підтипах РГЗ та особливостей взаємодій *ITSN2* з білками дозволить встановити можливу

роль окремих ізоформ *ITSN2* під час формування та розвитку цих пухлин.

Тому нами вивчено взаємозв'язок між рівнем експресії гена *ITSN2* і морфологічним варіантом, рецепторним типом, поширеністю первинного процесу (стадія захворювання) та результатами лікування хворих на РГЗ.

## ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У дослідження включено 84 жінки, хворих на РГЗ, віком від 32 до 74 років. Середній вік становив  $49,0 \pm 7,5$  року.

Усім пацієнткам до залучення в дослідження проводили стандартне обстеження з метою визначення стадії захворювання та морфологічної будови пухлини з обов'язковим встановленням її рецепторного статусу, ступеня диференціювання і проліферативного індексу (імуногістохімічне дослідження). Рівень експресії гена *ITSN2* у клітинах пухлини визначали методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України.

**Створення плазмідних конструкцій.** кДНК-последовності, що відповідають фрагменту  $\alpha$ -спіралного регіону та C2-домени *ITSN2*, одержували за допомогою ПЛР, використовуючи кДНК *ITSN2*, люб'язно надану доктором С. де ла Луна (Dr. S. de la Luna) із Центру досліджень геномної регуляції (Centre for Genomic Regulation), Барселона, Іспанія, та праймери:

*ITSN2-S For* 5' AGA AGC TTC AAG AAG AGG AGC C 3'

*ITSN2-S Rev* 5' AGC TCG AGC AAC TCA AGA TGA A 3'

*ITSN2-L For* 5' GAG AAT TCC AGC GAT GAG CCT G 3'

*ITSN2-L Rev* 5' CGC TCG AGG AAA TCA TCT GGT G 3'

ПЛР проводили в 50 мкл суміші, яка містила 0,4 мкМ кожного специфічного праймера, 1,5 мМ  $MgCl_2$ , 0,2 мМ dNTP кожного типу, 1,5 од. суміші ферментів High Fidelity PCR Enzyme Mix («Fermentas», Литва) і відповідний буфер. Ампліфікацію здійснювали за таких умов: денатурація — 94 °C протягом 40 с (у першому циклі — 2 хв); реасоціація з відповідними праймерами — 1 хв, елонгація — 72 °C, протягом 1 хв 35 циклів, на заключному етапі при 72 °C — 7 хв. Продукти реакцій розділяли в 1,5% агарозному гелі та очищали за допомогою набору реактивів Silica Bead DNA Gel Extraction Kit («Fermentas», Литва). Одержані продукти ПЛР клонували за сайтами HindIII, XhoI та EcoRI, XhoI у вектор для експресії в бактеріальних клітинах pET-28b («Novagen», США). Усі конструкції перевіряли секвенуванням.

**Експресія рекомбінантних білків у культурі клітин *E. coli* та їх очищення.** Трансформовані одержаними конструкціями клітини *E. coli* штаму

BL21 (DE3) pLysE висівали на чашку та інкубували протягом ночі при температурі 37 °C до появи окремих колоній. Колонію інокулювали в 5 мл рідкого LB з відповідним антибіотиком та інкубували впродовж ночі при інтенсивному перемішуванні зі швидкістю 220–250 об./хв. До 100 мл середовища 2xYTA додавали 1 мл клітинної суспензії та інкубували до досягнення суспензією оптичної густини  $OD_{600} = 0,6$ . Для індукції експресії рекомбінантного білка до клітин додавали розчин ізопропілтіо-D-галактозид (ІПТГ) до кінцевої концентрації 1 мМ та інкубували протягом 4–5 год при температурі 37 °C, після чого центрифугували при 6000 g протягом 15 хв. Для очистки рекомбінантних 6xHis-злитих білків клітини лізували в 5 мл буфера з 8 М сечовини, 100 мМ  $NaH_2PO_4$ , 10 мМ трис-HCl рН 8,0 та центрифугували при 14000 g протягом 20–30 хв при температурі 20 °C.

Для очищення рекомбінантних білків використовували систему «QIAexpress®» («Qiagen», Великобританія), яка базується на застосуванні нікельнітрилотриоцтової кислоти (Ni-NTA). 1 мл 50% розчину суспензії Ni-NTA-агарози в буфері для лізису додавали до 5 мл освітленого лізату та перемішували при температурі 4 °C протягом 4 год. Після інкубації суміш центрифугували при 3000 g протягом 10 хв при кімнатній температурі та двічі промивали 10 мл буферного розчину (8 М сечовини, 100 мМ  $NaH_2PO_4$ , 10 мМ трис-HCl рН 6,3). Зв'язаний білок елюювали 5 мл буфера для елюції (8 М сечовини, 100 мМ  $NaH_2PO_4$ , 10 мМ трис-HCl, рН 5,9, 250 мМ імідазолу). Елюований білок діалізували проти 5 л буферного розчину PBS (phosphate-buffered saline) упродовж 24 год при температурі 4 °C, двічі змінюючи буфер. Концентрацію білка визначали за Бредфордом [13].

**Отримання поліклональних антитіл.** Для отримання поліклональних антитіл кролів лінії «шиншила» 6-місячного віку імунізували 4 рази ін'єкціями уздовж хребта. Для першої імунізації використовували 200 мкг очищеного рекомбінантного білка в 1 мл 50% розчину повного ад'юванта Фрейнда в PBS. Другу і третю імунізацію проводили з інтервалом 4 тиж, використовуючи 200 мкг білка в 1 мл 50% розчину неповного ад'юванта Фрейнда в PBS. Останню підсилювальну імунізацію кролів проводили 200 мкг антигену в 500 мкл PBS без ад'юванта. Титр специфічних антитіл у сироватці крові імунізованих кролів визначали за методом ELISA. Для цього в лунки 96-лункових планшетів вносили по 0,5 мкг антигену в 100 мкл PBS, інкубували 1 год при температурі 37 °C, відмивали лунки від залишку ан-

тигену, що не зв'язався, двома об'ємами PBS та блокували неспецифічну сорбцію пластику додаванням 200 мкл 0,1% розчину Твін-20 в PBS з подальшою інкубацією при температурі 37 °C протягом 1 год. Сироватку крові імунізованих кролів вносили у розведенні 1:102–1:107. Як негативний контроль використовували сироватку крові неімунізованих кролів і неспецифічний антиген (0,5 мкг альбуміну бичачої сироватки (БСА) в 100 мкл PBS на лунку). Планшети тричі відмивали PBS з 0,1% розчином Твін-20 та інкубували 1 год з вторинними антитілами кози проти IgG кроля, кон'югованими з пероксидазою хрому («Promega», США), у розведенні 1:104. Потім лунки 3 рази відмивали PBS від залишку антитіл, що не зв'язалися, і проводили колоїметричну реакцію з використанням субстрату пероксидази хрому — АВТS (2,2'-азин-біс-[3-бензотіазолін-6-сульфо кислота]), який додавали в цитратному буфері (50 мМ  $Na_3C_6H_5O_7$ , рН=5,5), в концентрації 1 мг/мл. Інтенсивність забарвлення продуктів реакції вимірювали за допомогою фотометра «Anthos 2000» («Anthos Labled Instruments», Великобританія).

**Отримання препаратів РНК.** Зразки пухлин і тканин, які оточують пухлину (післяопераційний матеріал хворих на РГЗ), заморожували в рідкому азоті та зберігали при температурі –80 °C. Тотальну РНК виділяли з 0,2–0,4 г тканини гуанідинізоціанатним методом за допомогою реагента TriReagent («Sigma») згідно з рекомендаціями виробника та зберігали при температурі –80 °C. Якість РНК контролювали спектрофотометрично та за допомогою електрофорезу у борнатому буфері за денатуруючих умов.

**Синтез кДНК на препараті тотальної РНК.** У реакційну суміш загальним об'ємом 20 мкл вносили 2 мкг тотальної РНК, праймер (Oligo dT15) в кількості 100 мкМ, 4 мкл 5-кратного буфера, 2 мкл 10 мМ dNTP, 0,5 мкл інгібітора РНКаз (40 од./мкл), 1 мкл зворотної транскриптази RevertAid H Minus M-MuLV (Fermentas). Денатурацію РНК проводили при температурі 65 °C протягом 10 хв. Синтез РНК здійснювали при температурі 42 °C упродовж 1 год.

**ПЛР.** ПЛР виконували з використанням однієї пари праймерів і TaqMan зонду. Реакцію проводили в 25 мкл суміші, яка містила 0,2 мкМ кожного специфічного праймера та 0,1 мкМ TaqMan зонду, 1,5 мМ  $MgCl_2$ , 0,2 мМ dNTP, 2,5 од. Taq ДНК-полімерази «Fermentas» і відповідний буфер. Ампліфікацію здійснювали за таких умов: денатурація — 94 °C протягом 15 с (у першому циклі — 2 хв); температура реасоціації праймерів — 57 °C, час реасоціації праймерів і синтезу об'єднували — 1 хв,

60 циклів. ПЛР проводили на приладі iQ5 «BioRad».

Праймери, які використовували для ПЛР:

TBP:  
 For. TBP 634-654  
 GTGCCCGAAACGCCGAATATA

TaqMan зонд 655-676  
 (FAM) ATCCCAAGCGGT(BHQ1)  
 TTGCTGCGGT PO4

Rev. TBP 708-688  
 CCGTGGTTCGTGGCTCTCTTA  
 ITS2-S:

For. ITS2-S 3798-3821  
 CGTTAAGATGACGACAGACTCAGA  
 TaqMan зонд 3820-3844

(FAM) CAGCACACCACT(BHQ1)  
 GTTGACTTGGATC PO4  
 Rev. ITS2-S 3866-3845

ATTGTGTCCAGGTTTGCAGAT  
 ITS2-L:

For. ITS2-L 4324-4345  
 CGTACCACCTGCTCATCAGAA  
 TaqMan зонд 4362-4385

(FAM)CCCGGAGAGCCAT(BHQ1)  
 GCAGACCATTC PO4  
 Rev. ITS2-L 4382-4403

AGGGCCAGCTTTAGGGAGGAAT

Позиції нуклеотидів для праймерів відповідають кДНК TBP, довгої та короткої ізоформ ITS2 людини (реєстраційні номери в нуклеотидній базі даних GenBank NM\_006277, NM\_147152 та NM\_001172085.1 відповідно).

Для обчислення результатів ПЛР використовували формулу

$Exp = E_{target} - Ct(target) / E_{ref} - Ct(ref)$ ,  
 де  $E_{target}$  — ефективність ПЛР досліджуваного гена;

$E_{ref}$  — ефективність ПЛР референтного гена;

$Ct(target)$  — середнє значення циклів досліджуваного гена;

$Ct(ref)$  — середнє значення циклів референтного гена.

Статистичну обробку отриманих даних проводили з використанням пакета прикладної статистичної програми «Statistica 8.0». Визначали співвідношення рівня експресії ізоформ гена ITS2 з рецепторним типом і ступенем інвазії РГЗ, наявністю метастазів (стадія захворювання) та перебігом пухлинного процесу.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Створення поліклональних антитіл, специфічних до довгої та короткої ізоформ ITS2. Одними з основних функцій адапторних білків є участь у формуванні макромолекулярних комплексів і забезпечення зв'язку між сигнальними мережами клітини. Адапторні білки родини ITSN (ITSN1 та ITSN2) — мультидоменні, що дозволяє їм взаємодіяти з великою кількістю білків-партнерів. Понад 30 партнерів ITSN1 беруть

участь у різних клітинних процесах, тоді як на сьогодні відомо лише 4 білки, які взаємодіють з ITSN2. Хоча ITSN2 має високий рівень гомології з ITSN1, незначні відмінності в послідовності амінокислотних залишків можуть суттєво змінити його властивості як платформи для асоціації інших білків.

Для того, щоб вивчити взаємодії ITSN2 з білками, визначити особливості його функціонування та проаналізувати експресію ITSN2 у тканинах пухлин, необхідно одержати специфічні для ITSN2 антитіла, здатні розрізняти ITSN1 та ITSN2. Для цього створено рекомбінантні конструкції для експресії в клітинах прокариотів, які містили кДНК, що кодуєть фрагмент  $\alpha$ -спірального регіону (CCR) та C2-домен ITSN2, злиті з 6xHis-tag у векторі pET-28b. Їх вибрали як антигени для створення ITSN2-специфічних антитіл через їхню низьку гомологію до ITSN1 та високу імуногенність.

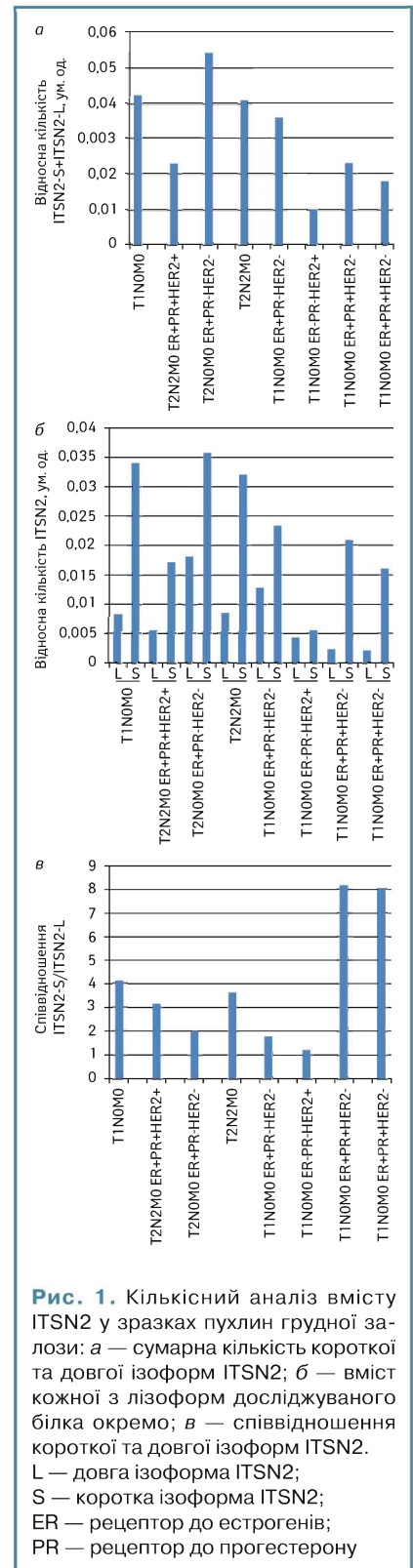
Результати останніх досліджень показують, що ендоцитоз впливає на різні внутрішньоклітинні сигнальні процеси, зокрема на сигнальні шляхи, що призводять до проліферації клітин ссавців. Найбільш досліджено прикладом такого впливу є інтерналізація рецепторних тирозинкіназ, яка є необхідною як для передачі сигналу, так і для інактивації рецептора [3]. Тому порушення ендоцитозу можуть призводити до гіперпроліферації та злоякісної трансформації. Дійсно, продемонстровано, що ITSN1 регулює убіквітинування та інтерналізацію рецептора епідермального фактора росту (EGFR) [6] і, можливо, є ключовим регулятором як ендоцитозу, так і внутрішньоклітинних сигнальних шляхів. Відомо, що ITSN1 взаємодіє з багатьма білками, важливими для інтерналізації рецепторів, такими як динамін, синаптоянін, Cbl, N-WASP, ендофілін [7–9]. Також показано, що пригнічення експресії ITSN1 за допомогою shRNA та siRNA призводить до активації апоптозу в ендотеліальних клітинах та нейронах [10, 11]. Залишається нез'ясованим, чи відіграє подібну роль у клітинах ITSN2.

**Аналіз експресії гена *ITSN2* у зразках пухлин пацієнтів із РГЗ методом вестерн-блот.** Щоб дослідити експресію гена *ITSN2* на рівні білка для приготування тканинних екстрактів, використано зразки РГЗ. Концентрація білка в отриманих екстрактах варіювала від 0,2 до 4 мкг/мкл. Для вестерн-блот-аналізу відібрано препарати з концентрацією білка щонайменше 0,7 мкг/мкл.

На рис. 1 представлено результати кількісної оцінки вмісту довгої та короткої ізоформ ITSN2 у досліджуваних зразках РГЗ. Найнижчий рівень експресії гена *ITSN2* (сумарна кількість довгої та короткої ізоформ) виявлено у зразку РГЗ із прогностично несприят-

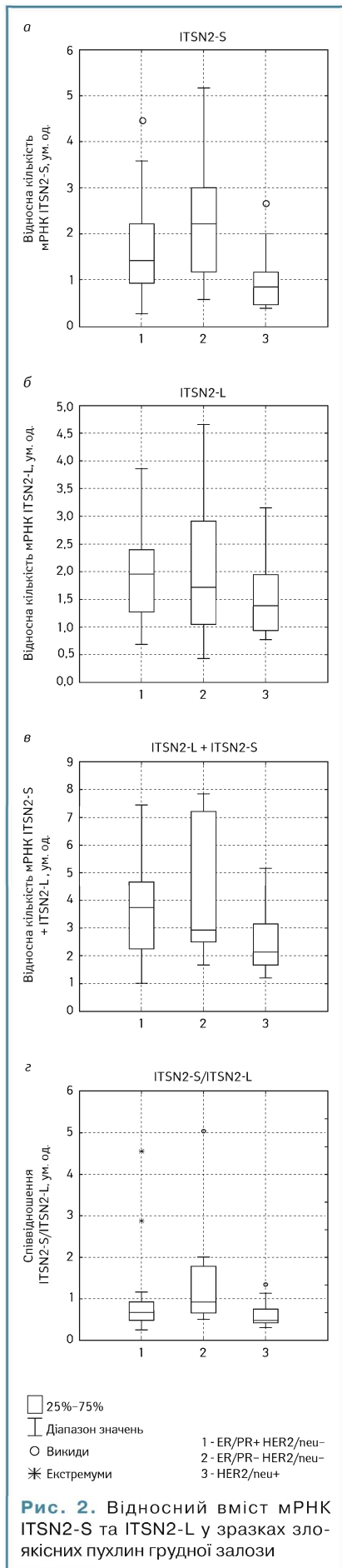
ливим рецепторним типом ER(–) PR(–) HER2/neu(+). Відносна кількість ITSN2 у цьому препараті РГЗ становила 19% від максимальної (див. рис. 1, а). Найвищі рівні експресії зафіксовано для зразків РГЗ з рецепторним статусом ER(+)  
 PR(–) HER2/neu(–).

Відомо, що експресія ізоформ деяких білків асоційована зі злоякісни-



**Рис. 1.** Кількісний аналіз вмісту ITSN2 у зразках пухлин грудної залози: а — сумарна кількість короткої та довгої ізоформ ITSN2; б — вміст кожної з ізоформ досліджуваного білка окремо; в — співвідношення короткої та довгої ізоформ ITSN2. L — довга ізоформа ITSN2; S — коротка ізоформа ITSN2; ER — рецептор до естрогенів; PR — рецептор до прогестерону





**Рис. 2.** Відносний вміст мРНК ITS2-S та ITS2-L у зразках злоякісних пухлин грудної залози

ми новоутвореннями. Ми перевірили співвідношення ізоформ ITS2 у досліджуваних зразках РГЗ (див. рис. 1, в). Відношення кількості короткої ізоформи ITS2 до кількості довгої варіювало від 1,2 до 7,9. При цьому найбільший відносний вміст довгої ізоформи виявлено у зразку РГЗ із прогностично несприятливим рецепторним статусом ER(-) PR(-) HER2/neu(+). Відношення ITS2-S до ITS2-L становило 1,2. Найменше довгої ізоформи виявлено в зразках ЗППЗ із прогностично сприятливим рецепторним типом ER(+) PR(+) HER2/neu(-). Відношення ITS2-S до ITS2-L наближається до 8. На жаль, якість лізатів зразків РГЗ та, відповідно, вестерн-блотів не дозволяла з високою достовірністю визначити інтенсивність сигналів на імуноблогах, тому аналіз експресії гена *ITS2* вирішили надалі проводити за допомогою кількісної зворотної-транскриптазної ПЛР (ЗТ-ПЛР) у реальному часі.

**Аналіз експресії *ITS2* у зразках пухлин грудної залози методом кількісної ЗТ-ПЛР.** Для аналізу експресії гена *ITS2* методом кількісної ЗТ-ПЛР у реальному часі ми підібрали праймери та TaqMan зонди, специфічні до короткої та довгої ізоформи *ITS2*. Праймери та зонди відповідали вимогам проведення ПЛР у реальному часі, довжина продуктів ПЛР для ITS2-S та ITS2-L становила 69 та 80 п.н. відповідно. TaqMan зонди містили флуоресцентну мітку FAM та гасник BHQ1. Для нормалізації результатів ПЛР вибрано ген «домашнього господарства» *TBP*, для якого показано відносно стабільний рівень експресії в різних нормальних тканинах та пухлинах, у тому числі й РГЗ [12, 13].

З 0,2 г хірургічно видалених зразків РГЗ та навколишніх тканин виділяли РНК за допомогою реагента TriReagent («Sigma») та перевіряли її інтактність електрофорезом у агарозному гелі. кДНК синтезували із 2 мкг тотальної РНК. Кількісну ЗТ-ПЛР проводили у трьох повторях.

Загальний рівень експресії короткої та довгої ізоформ *ITS2* у зразках РГЗ із рецепторним типом ER(+) PR(+) HER2/neu(-) становив 0,94–32,12 ум.од. (у середньому — 9,32 ум.од.). У препаратах РГЗ з рецепторним типом ER(-) PR(-) HER2/neu(-) він сягав 0,7–6,71 ум.од. (у середньому — 3,95 ум.од.).

У всіх проаналізованих зразках РГЗ із рецепторним статусом ER(+) PR(+) HER2/neu(-) у пацієнтів без метастазів у лімфовузлах вміст короткої форми мРНК *ITS2* у 4–30 разів перевищував кількість довгої форми.

Навпаки, у проаналізованих зразках РГЗ із рецепторним типом ER(-) PR(-) HER2/neu(-/+) співвідношення ITS2-S і ITS2-L у середньому становило 1,96. У двох зразках РГЗ вміст

довгої ізоформи перевищував кількість короткої ізоформи *ITS2*.

Середній вміст короткої та довгої ізоформ у зразках РГЗ із рецепторним статусом ER(+) PR(+) HER2/neu(-/+) у хворих без метастазів становив 6,13 та 0,6 ум.од. відповідно, а в препаратах ЗППЗ із рецепторним типом ER(-) PR(-) HER2/neu(-/+) — 2,2 ум.од. для ITS2-S та 1,75 ум.од. — для ITS2-L.

Дані щодо експресії *ITS2*, отримані за допомогою вестерн-блот-аналізу, узгоджувалися з результатами кількісної ЗТ-ПЛР. Так, у зразках РГЗ із рецепторним типом ER(-) PR(-) HER2/neu(+) низьке співвідношення ITS2-S і ITS2-L виявлено обома методами (1,2 — за даними вестерн-блотингу та 0,77 — за даними ЗТ-ПЛР) і, навпаки, у клітинах РГЗ із рецепторним типом ER(+) PR(+) HER2/neu(-) співвідношення ITS2-S і ITS2-L становило 8 — за даними вестерн-блот-аналізу і 9,1 — за результатами ЗТ-ПЛР.

У проаналізованих зразках РГЗ із рецепторним типом HER2/neu(+) вміст мРНК *ITS2* виявився нижчим, ніж у РГЗ із рецепторними типами ER(-) PR(-) HER2/neu(-) та ER(+) PR(+) HER2/neu(-) (рис. 2).

Достовірної відмінності в експресії довгої ізоформи *ITS2-L* у досліджуваних зразках РГЗ не виявлено. Навпаки, різниця в експресії короткої ізоформи *ITS2-S* в екстрактах із ЗППЗ у пацієнтів зі сприятливим та несприятливим прогнозом виявилася вищою, ніж відмінності в сумарній експресії двох основних ізоформ гена *ITS2*.

Таким чином, підвищений вміст довгої ізоформи *ITS2* у зразках РГЗ у пацієнтів із несприятливим прогнозом може бути додатковим прогностичним фактором перебігу захворювання. До складу довгої ізоформи *ITS2* входять відсутні в короткій формі домени DH, PH і C2, що беруть участь в активації полімеризації актину. Беручи до уваги важливість перебування актинового цитоскелета для міграції клітин, а також взаємодію *ITS2* з компонентами інвадоподій, можна припустити наявність зв'язку між підвищенням вмісту *ITS2-L* та зростанням інвазивності злоякісних клітин і утворенням метастазів, що потребує подальшого вивчення. Саме коротка форма *ITS2* може розглядатися як потенційний прогностичний маркер у хворих на РГЗ.

Подальші дослідження необхідні для підтвердження прогностичного потенціалу *ITS2* та можливості його використання як маркера прогнозу перебігу РГЗ.

## ВИСНОВКИ

1. Рівень експресії гена *ITS2* у зразках РГЗ може бути незалежним прогностичним фактором відсутності рецидивів захворювання. Високий рівень експресії

гена *ITSN2* корелював з відсутністю у хворих із рецепторним типом ER(+) PR(+/-) HER2/neu(-) віддалених метастазів і довгостроковою ремісією у хворих, які отримали радикальне лікування. Найнижчий рівень експресії гена *ITSN2* виявлено у хворих на РГЗ із рецепторним статусом ER(-) PR(-) HER2/neu(+), що має несприятливий прогноз.

2. Зразки РГЗ є гетерогенними як за кількістю довгої та короткої ізоформ мРНК *ITSN2*, так і за їх співвідношенням. Найнижчий вміст короткої ізоформи *ITSN2* — у зразках РГЗ хворих із рецепторним типом ER(+) PR(+) HER2/neu(-) та метастазами в лімфовузлах. Найбільший вміст зафіксовано у пацієнтів із тричі негативним рецепторним типом ER(-) PR(-) HER2/neu(-). Ці пухлини мали найвищий вміст як короткої, так і довгої ізоформи мРНК *ITSN2*.

3. При порівнянні співвідношення вмісту мРНК довгої та короткої ізоформ *ITSN2* у зразках РГЗ пацієнток без ме-

тастазів у лімфовузлах зі сприятливим прогнозом за цим показником значно переважає коротка ізоформа *ITSN2*, тоді як у хворих на РГЗ із несприятливим прогностичним статусом це співвідношення було значно меншим.

4. Підвищений вміст саме довгої ізоформи гена *ITSN2* у зразках РГЗ хворих із рецепторним типом ER(-) PR(-) HER2/neu(-) та несприятливим прогнозом може бути додатковим прогностичним фактором перебігу захворювання, що потребує подальшого вивчення.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Specht K., Harbeck N., Smida J. et al. (2008) Expression profiling identifies genes that predict recurrence of breast cancer after adjuvant CMF-based chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat*, 118: 45–56.
2. Pucharcos C., Estivill X., de la Luna S. (2000) Intersectin 2, a new multimodular protein involved in clathrin-mediated endocytosis. *FEBS Lett.*, 478: 43–51.
3. Sorkin A., Goh L.K. (2009) Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. *Exp. Cell Res.*, 315: 683–696.
4. Adams A., Thorn J.M., Yamabhai M. et al. (2000) Intersectin, an adaptor protein involved in clathrin-mediated

ated endocytosis, activates mitogenic signaling pathways. *J. Biol. Chem.*, 275: 27414–27420.

5. Laemlie U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259): 680–685.

6. Martin N.P., Mohnhey R.P., Dunn S. et al. (2006) Intersectin regulates epidermal growth factor receptor endocytosis, ubiquitylation, and signaling. *Mol. Pharmacol.*, 70: 1643–1653.

7. Sengar A.S., Wang W., Bishay J. et al. (1999) The EH and SH3 domain Eps proteins regulate endocytosis by linking to dynamin and Eps15. *EMBO J.*, 18: 1159–1171.

8. Yamabhai M., Hoffman N.G., Hardison N.L. et al. (1998) Intersectin, a novel adaptor protein with two Eps15 homology and five Src homology 3 domains. *J. Biol. Chem.*, 273: 31401–31407.

9. Hussain N., Jenna S., Glogauer M. et al. (2001) Endocytic protein intersectin-1 regulates actin assembly via Cdc42 and N-WASP. *Nat. Cell Biol.*, 3: 932–937.

10. Predescu S.A., Predescu D.N., Knezevic I. et al. (2007) Intersectin-1s regulates the mitochondrial apoptotic pathway in endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 282: 17166–17178.

11. Das M., Scappini E., Martin N.P. et al. (2007) Regulation of neuron survival through an intersectin-phosphoinositide 3-kinase C2beta-AKT pathway. *Mol. Cell Biol.*, 27: 7906–7917.

12. Radonic A., Thulke S., Mackay I.M. et al. (2004) Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 313: 856–862.

13. Drury S., Anderson H., Dowsett M. (2009) Selection of reference genes for normalization of qRT-PCR data derived from FFPE breast tumors. *Diagn. Mol. Pathol.*, 18: 103–107.

#### Прогнозирование течения рака грудной железы путем определения гена интерсектина *ITSN2*

Л.А. Сивак<sup>1</sup>, И.А. Крячок<sup>1</sup>, А.А. Губарева<sup>1</sup>, С.А. Лялкин<sup>1</sup>,  
Н.М. Майданевич<sup>1</sup>, А.В. Аскольский<sup>1</sup>, С.В. Кропивко<sup>2</sup>,  
А.В. Крикливая<sup>2</sup>, А.В. Новохацкая<sup>2</sup>, Л.А. Цыба<sup>2</sup>, А.В. Рындич<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Национальный институт рака, Киев

<sup>2</sup>Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев

**Резюме.** С учетом клинической и генетической гетерогенности рака грудной железы на сегодня одной из основных проблем является прогнозирование течения заболевания. Выявление сложных сетей белковых взаимодействий, изучение особенностей экспрессии гена в образцах опухоли и развитие технологий профилирования экспрессии генов *ITSN2* могут быть независимым прогностическим фактором отсутствия рецидивов заболевания.

**Ключевые слова:** рак грудной железы, ген интерсектин *ITSN2*, химиотерапия.

#### Prognosis of breast cancer course by identifying gene intersektyn *ITSN2*

L.A. Sivak<sup>1</sup>, I.A. Kryachok<sup>1</sup>, G.A. Gubareva<sup>1</sup>, S.A. Lyalkin<sup>1</sup>,  
N.M. Maidanevych<sup>1</sup>, A.V. Askolskyy<sup>1</sup>, S.V. Kropivko<sup>2</sup>, O.V. Kryklyva<sup>2</sup>,  
O.V. Novohatska<sup>2</sup>, L.O. Tsyba<sup>2</sup>, A.V. Ryndych<sup>2</sup>

<sup>1</sup>National Cancer Institute, Kyiv

<sup>2</sup>Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Kyiv

**Summary.** Given the clinical and genetic heterogeneity of breast cancer is by far one of the main problems is the prognosis of the disease. Detection of complex networks of protein interactions, study the characteristics of gene expression in tumor samples and the development of technology of gene expression profiling *ITSN2*, may be an independent prognostic factor for predicting the absence of relapses.

**Key words:** breast cancer, gene intersektyn *ITSN2*, chemotherapy.