

**Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии  
имени Н.Н. Блохина»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

*На правах рукописи*

**МИСЮРИН ВСЕВОЛОД АНДРЕЕВИЧ**

**PRAME – ДРАЙВЕРНЫЙ БЕЛОК КАНЦЕРОГЕНЕЗА И МИШЕНЬ  
ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ**

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

**Научный консультант**

доктор медицинских наук, профессор

**Киселевский Михаил Валентинович**

Москва – 2021 г.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	7
Актуальность темы и степень её разработанности .....	7
Цель исследования.....	9
Задачи исследования.....	9
Научная новизна.....	10
Теоретическая и практическая значимость.....	11
Методы и методология исследования .....	11
Положения, выносимые на защиту .....	13
Степень достоверности и апробация результатов.....	13
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	15
1.1. Особенности строения белков и генов группы <i>PRAME</i> .....	15
1.1.1. Открытие гена <i>PRAME</i> и его основные особенности .....	15
1.1.2. Способы определения активности гена и белка <i>PRAME</i> .....	17
1.1.3. Ген <i>PRAME</i> и гомологичные гены.....	20
1.1.4. Взаимодействие <i>PRAME</i> с другими белками .....	20
1.2. Драйверные свойства белка <i>PRAME</i> .....	22
1.3. Клиническое значение экспрессии <i>PRAME</i> при солидных опухолях.....	27
1.4. Клиническое значение экспрессии <i>PRAME</i> при онкогематологических заболеваниях .....	36
1.4.1. Прогностическое значение экспрессии <i>PRAME</i> при лимфопролиферативных заболеваниях .....	37
1.4.2. Активность <i>PRAME</i> при хроническом миелоидном лейкозе и миелодиспластическом синдроме .....	41
1.4.3. Активность и значение экспрессии <i>PRAME</i> при детских острых лейкозах.....	44

1.4.4. Активность и значение экспрессии <i>PRAME</i> при острых лейкозах взрослых.....	46
1.5. Парадоксальность <i>PRAME</i> .....	47
1.6. Активность <i>PRAME</i> у пациентов онкологическими заболеваниями в России.....	51
1.7. Опыт терапии <i>PRAME</i> -экспрессирующих злокачественных новообразований .....	54
1.8. Перспективы терапии <i>PRAME</i> -экспрессирующих опухолей .....	65
1.9. Заключение .....	68
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	69
2.1. Клинический материал.....	69
2.1.1. Определение прогностической значимости экспрессии гена <i>PRAME</i> при солидных опухолях биоинформатическими методами. ....	69
2.1.2. Определение транскрипционных факторов.....	71
2.1.3. Исследование эволюции генов группы <i>PRAME</i> .....	71
2.1.4. Больные онкогематологическими заболеваниями .....	72
2.2. Лабораторный материал.....	74
2.2.1. Ведение клеточных линий .....	74
2.2.2. Исследованные химиопрепараты.....	75
2.2.4. Выделение РНК.....	76
2.2.5. Синтез кДНК .....	76
2.2.6. Определение уровня экспрессии <i>PRAME</i> методом ПЦР в реальном времени .....	77
2.2.7. Получение антител .....	77
2.2.8. Оценка противоопухолевого эффекта антител <i>in vivo</i> .....	78
2.3. Методы статистического анализа .....	80

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ .....	82
3.1. Биоинформатический анализ происхождения, регуляции и драйверных свойств <i>PRAME</i> .....	82
3.1.1. Анализ происхождения генов семейства <i>PRAME</i> .....	82
3.1.2. Изменения профиля экспрессии генов и сигнальных путей после трансфекции клеток WI-38 геном <i>PRAME</i> .....	91
3.1.3. Сопоставление скорости роста линий клеток WI-38-vector и WI-38- <i>PRAME</i> в культуральной среде с низким содержанием сыворотки.....	95
3.1.4. Способность клеток линий WI-38-vector и WI-38- <i>PRAME</i> формировать колонии в полутвёрдой среде.....	98
3.1.5. Участие <i>PRAME</i> в процессах развития химиорезистентности ....	100
3.1.6. Изменение чувствительности линии клеток WI-38 к химиопрепаратам после активации экспрессии гена <i>PRAME</i> .....	102
3.2. Регуляция экспрессии гена <i>PRAME</i> .....	103
3.2.1. Активация экспрессии <i>PRAME</i> в опухолевых клетках в условиях стресса .....	103
3.2.2. Определение транскрипционных факторов, регулирующих активность гена <i>PRAME</i> .....	105
3.2.3. Использование тиопроизводных олигонуклеотидов для блокирования экспрессии гена <i>PHF8</i> .....	110
3.3. Прогностическая значимость экспрессии <i>PRAME</i> у больных солидными опухолями.....	111
3.4. Прогностическая значимость экспрессии <i>PRAME</i> у больных онкогематологическими заболеваниями .....	127
3.4.1. Фолликулярная лимфома.....	127
3.4.2. Т-клеточные лимфопролиферативные заболевания .....	133
3.4.3. Множественная миелома .....	137

3.4.4. Коэкспрессия генов <i>PRAME</i> и <i>PML-RAR<math>\alpha</math></i> и риск развития рецидива острого промиелоцитарного лейкоза .....	138
3.5. Разработка подходов к таргетной терапии <i>PRAME</i> -экспрессирующих опухолей .....	139
3.5.1. Результаты блокирования экспрессии гена <i>PHF8</i> в клетках меланомы A875 .....	139
3.5.2. Исследование синергизма бортезомиба и других химиопрепаратов на <i>PRAME</i> -экспрессирующих линиях .....	141
3.5.3. Оценка противоопухолевой активности анти- <i>PRAME</i> антител <i>in vivo</i> .....	148
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ .....	154
4.1. Значение активности гена <i>PRAME</i> в канцерогенезе .....	154
4.1.1. Транскрипционные факторы, регулирующие активность гена <i>PRAME</i> .....	154
4.1.2. Активация экспрессии <i>PRAME</i> в опухолевых клетках в условиях стресса .....	155
4.2. Драйверные свойства <i>PRAME</i> .....	156
4.3. Прогностическая значимость экспрессии гена <i>PRAME</i> .....	164
4.4. Прогностическая значимость экспрессии <i>PRAME</i> у больных онкогематологическими заболеваниями .....	167
4.4.1. Фолликулярная лимфома .....	167
4.4.2. Т-клеточные лимфопролиферативные заболевания .....	170
4.4.3. Множественная миелома .....	173
4.4.4. Значение экспрессии генов <i>PRAME</i> и <i>PML-RAR<math>\alpha</math></i> при определении риска развития рецидива острого промиелоцитарного лейкоза .....	173
4.5. Перспективные направления таргетной терапии <i>PRAME</i> -экспрессирующих заболеваний .....	175

4.5.1. Воздействие на уровне синтеза мРНК <i>PRAME</i> .....	175
4.5.2. Терапия на уровне белка <i>PRAME</i> .....	177
4.5.3. Терапия на уровне <i>PRAME</i> -экспрессирующей клетки .....	182
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	189
ВЫВОДЫ .....	192
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	193
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	196

## Введение

### Актуальность темы и степень её разработанности

Опухолевая клетка обладает множеством нарушений, отличающих её от нормальной. Этими нарушениями могут быть особенности иммунофенотипа, аберрантно-экспрессируемые внутриклеточные белки, наличие в них мутаций или образование химерных структур, либо полное отсутствие регуляторных белков. Их число постепенно увеличивается вследствие генетической нестабильности, а также воздействия химиопрепаратов и лучевой терапии. Ключевые дефекты называются драйверами канцерогенеза [1].

Теория драйвера связывает трансформацию клеток с дефектами так называемых драйверных генов. Согласно этой теории, возникновение опухоли происходит вследствие ряда специфических геномных изменений, которые последовательно вызывают метаболические и функциональные нарушения в соматических клетках [1].

Выделяют четыре базовых уровня, на которых могут возникнуть эти изменения. Первый уровень – метилирование регуляторных областей гена. Изменение уровня метилирования может наблюдаться по всему геному, однако наиболее значимые последствия будет иметь при деметилировании онкогенов и метилировании генов, кодирующих супрессоры опухоли, что опосредует пролиферацию и генетическую нестабильность опухолевой клетки [2]. Второй уровень связан с изменением профиля экспрессии микроРНК. Поскольку микроРНК регулируют активность множества генов путём сайленсинга и пострансляционных изменений, нарушения в их собственном профиле экспрессии связаны с дисфункциями регуляторных генов. По этим причинам микроРНК способны участвовать в онкогенезе [3]. Третий уровень – наличие мутаций в ряде значимых генов. Ряд генов, таких как *TP53* и *KRAS*, способен становиться драйверами вследствие появления мутаций, меняющих структуру и свойства белков, кодируемых ими. В мировой литературе именно мутации чаще всего упоминаются как драйверы [4, 5]. Мутации могут появляться не только в экзонах

генов, но также в регуляторных областях, таких как промоторы и энхансеры. Зачастую меняется уровень экспрессии генов, контролируемых мутировавшими регуляторными областями, что приводит к изменению количества мРНК и кодируемого ею белка [6, 7]. Любой из представленных дефектов может считаться драйверным, если придаёт селективные преимущества опухолевой клетке.

Результаты многочисленных экспериментальных исследований и собственный опыт позволили предположить, что раково-тестикулярный белок PRAME, активный в опухоли и не экспрессирующийся в соматической клетке, также обладает свойствами, позволяющими определить его как драйверный белок [8-28].

Исследования свойств белка PRAME осложняются тем, что у него нет ферментативного центра, он не входит в состав цитоскелета и не способен напрямую взаимодействовать с ДНК. Несмотря на это, белок участвует в формировании некоторых комплексов, в том числе вместе с убиквитинлигазой Cull2, перерабатывающей лишние или повреждённые белки, транскрипционного комплекса белков [29]. По этой причине сложно объяснить, чем обусловлено ухудшение прогноза у PRAME-экспрессирующих пациентов с онкологическими заболеваниями. Однако снижение времени выживаемости и химиорезистентность во многих случаях связана с активностью в опухоли белка PRAME [8-28].

PRAME может рассматриваться не только как драйвер канцерогенеза, но и как терапевтическая мишень. Такая возможность иллюстрируется несколькими примерами. Известно, что основной особенностью хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ), является химерный белок BCR-ABL. Этот химерный белок представляет собой одновременно главный маркер заболевания, драйвер лейкемогенеза и мишень для ингибиторов тирозинкиназ (ИТК). Именно поэтому обнаружение транскриптов гена *BCR-ABL* и определение спектра его мутаций становится основанием для применения ИТК, таких как иматиниб, понатиниб и другие [30]. Зачастую эти препараты, применяемые в монорежиме, позволяют достигнуть не только подавления роста опухоли, но также полностью излечить больного.



Таким образом, подход по использованию единственного фактора в качестве мишени действительно работает. Однако в случае PRAME ещё неизвестно, как именно можно проводить таргетную терапию. В отличие от BCR-ABL, PRAME не имеет известной структурной особенности, на которую можно было бы воздействовать при помощи малой молекулы. По этой причине необходимо продолжить исследования структуры гена *PRAME*, оценить взаимодействие белка PRAME с другими белками, а также проверить возможность воздействия иммунопрепаратов на клетку, экспрессирующую *PRAME*.

Несмотря на незавершённость представлений о функциях белка PRAME, уже сейчас можно оценить перспективы PRAME-направленной терапии. Практика показывает, что экспрессия *PRAME* наблюдается часто. В ряде онкологических заболеваний она наблюдается практически в 100% случаев. Поскольку любой белок и кодирующий его ген имеют уникальные последовательности аминокислот или нуклеотидов, это позволяет разрабатывать соединения, способные с ним связываться и блокировать его функции. Так как наличие PRAME в опухоли связано с неблагоприятным клиническим исходом, разработка методов таргетной терапии становится особенно актуальной. При этом есть основания предполагать, что разработанные методы будут относительно безопасны для самого больного, так как в его здоровых клетках PRAME не активен [31].

Общий объём исследований, затрагивающих различные аспекты клинического и биологического значения экспрессии PRAME, достаточно велик. Однако многие аспекты данной проблемы далеки от разрешения, а имеющиеся данные во многом противоречивы.

### **Цель исследования**

Изучение PRAME как драйверного белка канцерогенеза и мишени противоопухолевой терапии.

### **Задачи исследования**

1. Доказать драйверные свойства белка PRAME на модели неопухолевой клеточной линии.

2. Охарактеризовать прогностическое значение экспрессии *PRAME* при солидных опухолях и лимфопролиферативных заболеваниях.
3. Определить транскрипционные факторы, регулирующие активность гена *PRAME*.
4. Разработать антисенс-олигонуклеотиды для инактивации транскрипционных факторов, активирующих ген *PRAME*.
5. Оценить влияние бортезомиба и противоопухолевых цитостатиков на выживаемость клеточных линий меланомы, рака лёгких, рака молочной железы и рака толстой кишки.
6. Оценить эффективность анти-*PRAME* антитела на модели *PRAME*-экспрессирующих ксенографтов.

### Научная новизна

Впервые продемонстрированы драйверные свойства гена *PRAME* на модели неопухолевой диплоидной клеточной линии фибробластов человека WI-38, трансфицированных вектором для экспрессии *PRAME*. Установлено, что высокий уровень экспрессии *PRAME* коррелирует со снижением параметров как общей, так и бессобытийной выживаемости при аденокарциноме, раке молочной железы, раке толстого кишечника, плоскоклеточном раке головы и шеи, светлоклеточной карциноме почки, аденокарциноме и плоскоклеточном раке лёгкого, аденокарциноме поджелудочной железы, меланоме кожи и раке эндометрия.

Установлена корреляция между выявлением опухолевых клеток в биологических образцах больных ФЛ и Т-кЛ с экспрессией *PRAME*, а также прямая зависимость между уровнем экспрессии *PRAME* и величиной индекса Ki-67. Таким образом, определение экспрессии *PRAME* может служить дополнительным маркером диссеминации и пролиферативной активности лимфатической опухоли.

Получены новые данные, характеризующие прямую связь между уровнем экспрессии *PRAME* и химиорезистентностью и роль транскрипционного фактора PNF8 в экспрессии *PRAME*. Разработан антисмысловый олигонуклеотид для

блокирования экспрессии мРНК *PHF8*, результатом чего становится снижение уровня экспрессии *PRAME*.

Впервые установлено синергичное цитотоксическое воздействие бортезомиба с цисплатином, цитарабином, доксорубицином, мелфаланом и циклофосфамидом по отношению к *PRAME*-экспрессирующим линиям опухолевых клеток.

Разработан препарат химерных моноклональных антител для терапии *PRAME*-позитивных онкологических заболеваний.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Продемонстрирована возможность нокаута транскрипционного фактора *PHF8*, активирующего экспрессию *PRAME*, что делает опухолевые клетки меланомы менее устойчивыми к терапии цисплатином. Данная информация может использоваться как обоснование для разработки новых препаратов для инактивации *PHF8*, которые могут иметь значимый терапевтический эффект.

Полученные данные позволяют выделить прогностически наиболее неблагоприятную группу больных фолликулярной лимфомой, и использовать международный прогностический индекс FLIPI с большей точностью.

Бортезомиб может быть рекомендован в клиническую практику для увеличения чувствительности *PRAME*-экспрессирующих опухолей к таким химиопрепаратам как цисплатин, цитарабин, доксорубицин, мелфалан и циклофосфамид.

Разработанное химерное *PRAME*-распознающее антитело 6H8 представляет практический интерес для терапии *PRAME*-экспрессирующих опухолей.

### **Методы и методология исследования**

Проводились эксперименты на клеточных опухолевых линиях A875, SKBR-3, A549, HCT-116 и ряда линий меланомы серии mel. Для исследования драйверных свойств *PRAME* была создана модель, в которой неопухолевая линия WI-38 была трансфицирована вектором для экспрессии *PRAME*. В работе с линиями

использовались методы МТТ, количественной ПЦР в реальном времени и анализ экспрессии генов на микрочипах.

Оценка противоопухолевого эффекта PRAME-распознающих мышинных и химерных антител проводилась на ксенографтных моделях. Проводилось исследование скорости торможения роста опухоли.

В исследование включены данные об экспрессии PRAME у 9135 больных со следующими диагнозами: аденокортикальный рак (n=77), рак мочевого пузыря (n=400), инвазивный рак молочной железы (n=1066), плоскоклеточный рак шейки матки и эндоцервикальная аденокарцинома (n=292), холангиокарцинома (n=36), рак толстой кишки (n=270), диффузная В-крупноклеточная лимфома (n=46), рак пищевода (n=182), мультиформная глиобластома (n=156), плоскоклеточный рак головы и шеи (n=518), хромофобный рак почки (n=58), папиллярный рак почки (n=517), светлоклеточная карцинома почек (n=283), острый миелоидный лейкоз (n=106), глиома головного мозга (n=514), гепатоцеллюлярная карцинома (n=354), аденокарцинома легкого (n=476), плоскоклеточный рак легкого (n=383), мезотелиома плевры (n=81), серозная цистаденокарцинома яичника (n=425), аденокарцинома поджелудочной железы (n=178), рак предстательной железы (n=469), колоректальный рак (n=90), саркомы мягких тканей (n=256), меланома кожи (n=459), рак желудка (n=384), опухоли зародышевых клеток (n=136), рак щитовидной железы (n=429), тимома (n=118), рак эндометрия (n=172), карциносаркома матки (n=56) и увеальная меланома (n=78). Были доступны подробные клинические данные больных с диагнозом фолликулярная лимфома (n=34) и больных Т-клеточными лимфопролиферативными заболеваниями (n=36).

Биоинформатические исследования проводились методами выравнивания генетических последовательностей и картирования генов. Для анализа данных выживаемости больных использовался лог-ранговый критерий. Для анализа связи активности PRAME и других клинических признаков использовались такие подходы как кластеризация данных, применение критерия Уилкоксона для связанных и критерия Манна-Уитни для несвязанных выборок.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Ген *PRAME* человека обладает свойствами драйвера онкогенеза, которые проявляются как в нормальной клетке WI-38, так и в опухолевой.
2. Снижение времени выживаемости больных онкологическими заболеваниями и уменьшение результативности терапии коррелирует с высоким уровнем экспрессии *PRAME*.
3. Ингибитор протеасом бортезомиб позволяет обратить последствия экспрессии *PRAME* в опухолевой клетке.
4. Мышиные и химерные *PRAME*-распознающие антитела обладают противоопухолевым эффектом в условиях *in vivo*.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

При выполнении экспериментальных исследований использовали необходимые положительные и отрицательные контроли. При анализе результатов оценивали их статистическую значимость посредством статистических критериев, каждый из которых был выбран для использования только при соблюдении необходимых условий их применимости.

По теме диссертации опубликовано 18 научных работ, в том числе 17 в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России. Основные положения научной работы представлены на научных конференциях в России и за рубежом, в том числе на 19th Congress of the European Hematology Association (Милан, 2014); XI Российской конференции с международным участием «Злокачественные лимфомы» (Милан, 2014); Научной Сессии НИЯУ МИФИ «Наноматериалы для терапии, диагностики и мониторинга результатов лечения» (Москва, 2015); VII Съезде Российского общества медицинских генетиков, (Санкт-Петербург, 2015); XIX Российском онкологическом конгрессе, (Москва, 2015); III конгрессе гематологов России, Москва, (Москва, 2016); XI и XII Всероссийской научно-практической конференции «Противоопухолевая терапия: от эксперимента к клинике», (Москва, 2014 и 2015); XIII и XIV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные

противоопухолевые препараты» памяти А.Ю. Барышникова, (Москва, 2016 и 2017); Конференции с международным участием «Меланома и опухоли кожи», (Москва, 2018); IV, V и IV Петербургском онкологическом Форуме «Белые ночи» Санкт-Петербург, 2018, 2019 и 2020); I, II, III, IV и V Всероссийской конференции по молекулярной онкологии (Москва, 2015, 2016, 2017, 2018 и 2019); Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных "Ломоносов-2019", (Москва, 2019).

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Особенности строения белков и генов группы *PRAME*

#### 1.1.1. Открытие гена *PRAME* и его основные особенности

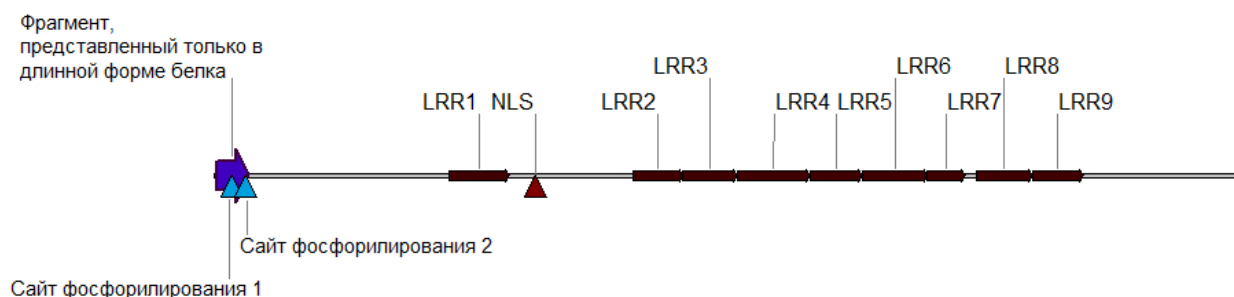
Ген *PRAME* относится к семейству так называемых раково-тестикулярных генов (РТГ). У взрослого человека эти гены активных в основном в половых клетках и не экспрессируются в соматических. При злокачественном перерождении нарушаются процессы регуляции транскрипции, что может приводить к спонтанной активации РТГ, в том числе *PRAME*. Поскольку половые клетки находятся в иммунопривилегированных зонах, белки, кодируемые РТГ, являются для иммунной системы новыми. В случае появления этих белков в опухоли, иммунная система может распознать их как чужеродные. Следствием этого может быть развитие иммунного ответа, что и наблюдается в случае экспрессии *PRAME*.

Открытие белка *PRAME* было совершено группой Ikeda и соавт. в 1997 году при исследовании причин спонтанной ремиссии у больного меланомой [32]. Линия меланомы, полученная от этого больного, подвергалась лизису аутологичными CD8<sup>+</sup> Т-клетками. Исследователями был обнаружен эпитоп безымянного на тот момент белка, распознаваемый этими клетками. Структура этого HLA-A2-презентируемого эпитопа позволила установить всю последовательность белка, благодаря своему паттерну экспрессии получившего название *PRAME* (PReferentially Expressed Melanoma Antigen).

Зрелый белок *PRAME* существует в двух формах – длинной, состоящей из 509 аминокислотных остатков (а.о.), и короткой, имеющей длину 493 а.о. Укороченная форма отличается от длинной отсутствием 16 С-концевых а.о., которые содержат два сайта фосфорилирования. Форма белка *PRAME* из 509 а.о. является наиболее экспрессируемой и наиболее изученной [33] (Рисунок 1). Именно она была впервые описана группой Ikeda, и в дальнейшем исследовалась другими авторами, благодаря чему может считаться «классической». В

подавляющем большинстве источников литературы описана именно эта форма. По этой причине мы будем описывать строение белка исходя из этой формы.

К настоящему моменту установлено, что активность гена *PRAME* широко распространена при многих онкологических заболеваниях. В числе этих заболеваний меланома, рак молочной железы, рак почки, остеосаркома и другие. При меланоме и большинстве других солидных опухолях активность *PRAME* в клетках опухоли ассоциирована с распространением метастаз и развитием резистентности к терапии. В целом свойства *PRAME* связаны с ухудшением прогноза у больных [32, 33].



**Рисунок 1** – Первичная структура белка PRAME

Ген *PRAME* отличается от большинства РТГ тем, что его экспрессия в значительной степени связана с уровнем метилирования последовательности промотора и первых экзонов [35]. Это было многократно подтверждено экспериментально. В *PRAME*-негативных клетках здорового человека CpG-динуклеотиды в промоторной зоне и в первых экзонах гена *PRAME* в основном метилированы. Вследствие этого продвижение транскрипционного комплекса по последовательности гена затруднено, и его экспрессия не осуществляется. В клетках *PRAME*-позитивного рака мочевого пузыря последовательности гена *PRAME* были менее метилированы, чем в клетках здоровой ткани мочевого пузыря, в которых *PRAME* не экспрессировался [36].

Следует отметить, что среди опухолевых клеток *PRAME* может экспрессироваться гетерогенно, что было впервые обнаружено у больного меланомой. Из образца опухоли данного больного были выделены клоны, уровень



экспрессии гена *PRAME* в которых оказался различным. Статус метилирования последовательностей *PRAME* также существенно различался от клона к клону. Наблюдалась прямая корреляция между числом деметилированных динуклеотидов CpG и уровнем экспрессии *PRAME* [37]. Подтверждение значимости статуса метилирования в регуировке активности *PRAME* находят также в том, что деметилирующие агенты, такие как децитабин и азацитидин, позволяют значительно увеличить уровень экспрессии *PRAME* [38, 39]. В частности, децитабин повысил уровень экспрессии *PRAME* в клеточных линиях рака яичников [40]. Интересно, что в клетках крови здорового донора деметилирование не приводило к активации экспрессии *PRAME* [39].

Из этого следует, что «открытости» промотора для транскрипционных факторов может быть недостаточно для активации экспрессии *PRAME*. Возможно, требуется активность опухоль-специфического транскрипционного фактора или сигнального пути.

Существуют свидетельства активации экспрессии *PRAME* сигнальными путями врождённого иммунного ответа, вероятно, NF-κB [33]. Как известно, активность NF-κB часто характерна для опухолевых клеток [41-47]. Можно предположить, что сочетание деметилирования промотора и NF-κB-сигналинг могут быть основной причиной активности *PRAME* в опухоли, однако для разрешения этого вопроса ещё не проводили исследований.

### **1.1.2. Способы определения активности гена и белка PRAME**

Для более полного представления клинического значения экспрессии *PRAME* следует ознакомиться с методами детекции активности данного гена мРНК и транслируемого на её основе белка.

На сегодняшний день открыто более десяти вариантов сплайсинга мРНК *PRAME*. При этом каждый вариант содержит в себе последовательность о полноразмерном белке [38]. В связи с этим для изучения паттерна экспрессии *PRAME* оптимально использовать такие системы праймеров для ПЦР, которые позволяют обнаруживать транслируемые фрагменты РНК. Для этого следует

подбирать пары праймеров, фланкирующих стык экзонов 2 и 3, 3 и 4 или 4 и 5 гена *PRAME*. Первооткрыватели *PRAME* под руководством Ikeda использовали системы праймеров, охватывающих место слияния экзонов 4 и 5. Используя классический метод ПЦР продуктов обратной транскрипции (ОТ-ПЦР), Ikeda et al. установили, что гиперэкспрессия *PRAME* широко встречается при онкологических заболеваниях [32]. Несколько позднее исследователи под руководством Oberthuer A. сравнили разрешающую способность методов нозерн-блоттинга мРНК, ОТ-ПЦР и количественной ПЦР в реальном времени с использованием интеркалирующего красителя для определения уровня экспрессии *PRAME*. Количественные результаты ПЦР коррелировали между собой и с полуколичественными результатами нозерн-блоттинга. Но из-за низкой разрешающей способности нозерн-блоттинга по сравнению с различными вариантами ПЦР авторы предложили использовать последние методы в дальнейшем для детекции мРНК *PRAME* [48].

В последующем были испытаны методики ПЦР-диагностики микрометастазов меланомы. Специфичность такого метода была очень высокой – 99% [49]. Наконец, в недавнем прошлом были начаты испытания метода неинвазивной диагностики меланомы, основанной на снятии специальным пластырем верхнего слоя эпидермиса, выделения тотальной РНК и тестирования уровня экспрессии меланома-ассоциированных генов *LINC* и *PRAME* [50]. В настоящий момент достигнута очень высокая чувствительность метода (91%), и проверяются различные способы увеличения специфичности (в настоящее время специфичность составляет 69%) [51].

Помимо определения активности *PRAME* на уровне мРНК разработаны антитела для оценки количества белка в образцах опухолевой ткани. Данные по уровню экспрессии белка и мРНК для одного и того же образца обычно сопоставимы. Так, при раке яичников обнаружена корреляция уровня экспрессии мРНК и белка *PRAME* [52]. Данные полимеразной цепной реакции (ПЦР) и иммуногистохимического анализа (ИГХ) хорошо коррелируют при увеальной меланоме [53]. Значимое преимущество иммунологических методов детекции –

возможность установить архитектуру опухолевой ткани, в которой можно наблюдать PRAME-экспрессирующие клетки опухоли и PRAME-негативные клетки неопухолевого ткани. Однако разрешающая способность иммунологических методов значительно ниже, чем у ПЦР. Вероятно, по этой причине в наши дни не распространено определение уровня экспрессии белка PRAME в диагностических целях.

При оценке частоты активности *PRAME* при различных нозологиях разными исследовательскими группами не всегда были получены одинаковые результаты. Это объясняется различиями в методах детекции, и прежде всего в выбранном пороговом уровне экспрессии, разделяющем положительные и отрицательные случаи. Самые чувствительные системы для проведения ПЦР позволяли детектировать экспрессию *PRAME* у здоровых доноров, но в этих случаях активность гена у больных была выше минимум на порядок [33, 48-51].

Прогностические модели на основе уровня экспрессии PRAME также создавались разными методами. В некоторых случаях исследователи сравнивали между собой клинические параметры больных, абсолютно негативных по экспрессии *PRAME*, с больными, у которых наблюдалась активность *PRAME* на любом уровне [49-69]. В тех случаях, когда активность *PRAME* определяли количественно и наблюдали в клетках здоровых доноров, для выделения неблагоприятных групп иногда устанавливали значения экспрессии гена, находящиеся на уровне в 10 или 100 раз больше, чем наблюдаемый у здоровых доноров [33, 48-50, 70-79]. Использовался также способ ранжирования групп больных согласно величине экспрессии *PRAME*. Например, результаты терапии 25% больных с наиболее высоким уровнем сравнивали с результатами, полученными у 50% больных с промежуточным уровнем экспрессии и 25% с самым низким из наблюдаемых уровней [76, 80-84]. Наконец, для выделения неблагоприятной прогностической группы больных в исследованиях Mitsuhashi et al. и Ercolak et al. были подобраны такие значения уровня экспрессии *PRAME*, при которых кривые выживаемости расходились в наибольшей степени [63].

### 1.1.3. Ген *PRAME* и гомологичные гены

Примерно половина всех РТГ расположена на хромосоме X, вследствие чего их называют X-хромосомными. *PRAME* относится к так называемым аутосомным РТГ, так как расположен в хромосоме 22, в локусе гена  $\lambda$ -цепи иммуноглобулина. Большинство X-хромосомных РТГ существует в виде кластеров гомологичных генов, в то время как аутосомные РТГ обычно представлены единичными копиями [85, 86]. Анализ строения генома человека показывает, что ген *PRAME* не типично для аутосомных РТГ имеет множество гомологичных генов и неэкспрессируемых псевдогенов [87]. Кластер *PRAME*-подобных генов человека расположен в хромосоме 1. Профиль экспрессии генов, полученный на микрочипах для тканей здорового человека и множества образцов опухоли, показывает, что *PRAME*-подобные гены практически не активны. Строение этих генов делает маловероятным выявление их мРНК при помощи систем, разработанных специально для «классического» гена *PRAME*. Группы представлены не только у человека и приматов, но и у других млекопитающих.

Ген *PRAME* и его гомологи обнаружены не только у человека. Ряд млекопитающих, прежде всего плацентарных, обладает множеством копий гена *PRAME* [87]. Другие, такие как сумчатые и некоторые плацентарные, часто имеют всего по одной копии на весь геном. Объяснения биологического значения данного явления в настоящее время нет, что затрудняет понимание значения экспрессии гена *PRAME* у человека в норме и при онкологических заболеваниях.

### 1.1.4. Взаимодействие *PRAME* с другими белками

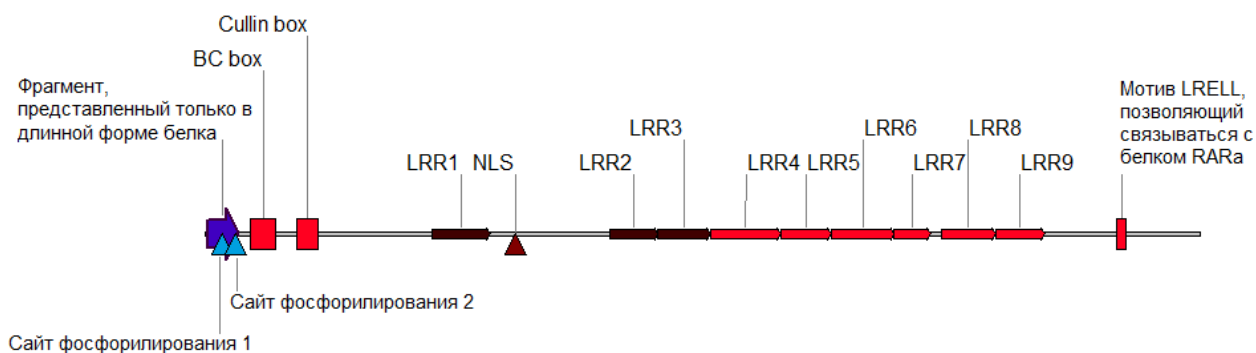
Третичная структура белка *PRAME* подковообразна, типичная для всех лейцин-богатых белков [88]. В белке расположено девять лейцин-богатых (LLR) мотивов, имеющих типичную последовательность LXXL, где X – любая аминокислота. Мотивы охватывают следующие структуры: а.о. 116-145, 207-231, 232-258, 259-294, 295-320, 321-352, 353-371, 377-404 и 405-429. Подобное строение позволяет ассоциироваться с разнообразными структурами [87], прежде всего белковой природы, но не исключена возможность взаимодействия и с нуклеиновыми кислотами (Рисунок 2).

На С-конце PRAME находится мотив для связывания с белком cullin 2 и белками elongin B и elongin C, кофакторами cullin 2 [33]. Между первым и вторым LRR расположен сигнал ядерной локализации (NLS, а.о. 154-164).

А.о. 467-471 (мотив LRELL) позволяют белку PRAME взаимодействовать с белком RAR $\alpha$  [88]. Сравнение структуры PRAME с другими лейцин-богатыми белками позволяет предположить, что центральная часть белка опосредует другие взаимодействия [87]. Этому есть подтверждения: белок PRAMEF7 мыши при помощи этих мотивов (а.о. 322-322, 351-362 и 379-388, соответствуют а.о. 350-361, 380-391 и 408-417 белка PRAME человека) связывается с мышинным белком UHRF1 [87, 89].

PRAME человека также способен связываться с репрессором транскрипции генов EZH2 и комплексом белков EKS/KEOPS [29]. Однако не установлено, какие компоненты белка для этого используются.

Наконец, PRAME человека способен ассоциироваться с гистоновыми белками: в наибольшей степени – с белком H3 и в несколько меньшей – с H4, H2 [33] и с метилтрансферазой гистонов EZH2 [88]. Неизвестно, какие а.о. белка PRAME принимают участие в этих взаимодействиях.



**Рисунок 2** – Карта взаимодействия белка PRAME с другими белками. Красные прямоугольники – известные места связывания с другими белками. Красными стрелками отмечены фрагменты первичной структуры, потенциально значимые для взаимодействия с белками-субстратами

Возможность образования комплекса PRAME вместе с cullin 2 и белками elongin B и C позволяет предположить, что его главное свойство –

убиквитинирование. Само убиквитинирование осуществляет *cullin 2*, в то время как PRAME распознаёт белки-субстраты. Подтверждением данного свойства служит наблюдение PRAMEF7-опосредованного убиквитинирования белка UFRF7 [89], но этот эксперимент описывает мышинные белки. Убиквитинирование посредством белка PRAME человека никогда не наблюдали. Остаются неизвестными также потенциальные субстраты для убиквитинирования. Возможно, PRAME осуществляет моноубиквитинирование белка H2B, что приводит к увеличению интенсивности транскрипции гена [90].

## 1.2. Драйверные свойства белка PRAME

Активность гена или белка PRAME связана с ранней летальностью, химиорезистентностью, метастазированием и большим риском развития рецидива при хроническом миелоидном лейкозе [30], раке яичника [91], раке молочной железы [81], раке почки [67], медуллобластоме [92], меланоме и множестве других онкологических заболеваний. Высокий уровень экспрессии *PRAME* прямо связан с прогрессией остеосаркомы [93]. При меланоме и раке молочной железы гиперэкспрессия *PRAME* не ассоциирована со стадией заболевания, но значительно ухудшает прогноз [81, 94]. При раке молочной железы *доказана* независимая негативная прогностическая значимость гиперэкспрессии PRAME [82].

Из этих особенностей следует, что активность белка PRAME может быть связана с формированием отличительных признаков опухолевых клеток и усугублять течение онкологического заболевания [95, 96].

Связь между наличием белка PRAME в опухоли и этими отличительными признаками, систематизированными в работах продемонстрирована во многих независимых исследованиях. Разберём каждый из этих признаков.

*Самодостаточность в пролиферативных сигналах.* PRAME-экспрессирующие бластные клетки, циркулирующие у больных хроническим миелоидным лейкозом, способны к автономному существованию. В отличие от нормальных гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) бласты не зависят от наличия в среде сигнальных молекул [30]. Нокаут гена *PRAME* в клетках линии K562 приводил к значительному снижению их способности формировать колонии

[8]. При эстроген-независимом и тройном негативном раке молочной железы уровень экспрессии гена *PRAME* в целом выше по сравнению с другими типами опухоли, зависимыми от эстрогена [81]. Таким образом, активность *PRAME* связана с самодостаточностью опухолевой клетки в пролиферативных сигналах.

*Изменения метаболизма.* Белок *PRAME* функционирует как модулятор экспрессии генов. Предпочтительно *PRAME* ассоциируется с мотивом ССААТ, находящимся в составе промоторов и энхансеров, распознающихся транскрипционным фактором NFY. Данная группа промоторов регулирует экспрессию генов, ответственных за активный метаболизм и проонкогенные сигнальные пути. На основании обнаруженных модификаций гистоновых белков H3K9ac и H3K4me3 была доказана *PRAME*-опосредованная активация экспрессии данных генов [9]. Данное свойство позволяет белку *PRAME* ускорять метаболизм опухолевой клетки.

*Ослабление индукции апоптоза.* При хроническом миелоидном лейкозе белок *PRAME* блокирует экспрессию гена *TRAIL*, важного активатора апоптоза [10]. В клетках острых лейкозов при нокауте экспрессии *PRAME* прокаспаза-3 преобразуется в активную каспазу, и стимулирует клеточную гибель [11]. В клетках линии HepG2, раке печени, белок *PRAME* стимулирует экспрессию p21, проводящего арест клеточного цикла в фазах G0/G1, а также подавляет апоптоз посредством блокирования экспрессии p53 [12]. Нокаут гена *PRAME* в линии меланомы A375 и линии рака печени сопровождался снижением скорости пролиферации и увеличением доли клеток, находящихся в процессе апоптоза [12, 13]. Таким образом, в ряде онкологических заболеваний доказана *PRAME*-опосредованная резистентность клеток к апоптозу.

*Генетическая нестабильность.* Наблюдается ассоциация экспрессии гена *PRAME* и наличия множества хромосомных аномалий у больных метастатической увеальной меланомой. У данных больных также наблюдалась значительная активность систем репарации ДНК. В подобных условиях разрывы негомологичных хромосом могут быть быстро восстановлены, что и приводит к формированию хромосомных транслокаций [53]. Прямая связь между

гиперэкспрессией *PRAME* и появлением дополнительных хромосомных аномалий наблюдалась также при ХМЛ [14, 15]. *PRAME*-опосредованное увеличение скорости пролиферации и резистентность к апоптозу позволяет этим аномалиям сохраниться в опухоли. Отсюда следует вывод об участии белка *PRAME* в формировании генетической нестабильности.

*Неоангиогенез.* Прямых свидетельств вовлечённости гена *PRAME* в васкулогенез в литературе нет. Можно сопоставить между собой следующие два независимо полученных факта: немелкоклеточный рак лёгких характеризуется гипоксией и экспрессией VEGF с последующим ангиогенезом [16] и более, чем в половине случаев при данном заболевании наблюдается активность *PRAME* [17]. Более тесно связь между уровнем экспрессии *PRAME* в опухолевой клетке и этапами неоангиогенеза не исследовалась.

*Нечувствительность к рост-ингибирующим сигналам.* Ретиноевая кислота передаёт сигнал, ингибирующий пролиферацию и активирующий программу дифференцировки клеток множества типов, в том числе у эмбриона [18]. Нокаут *PRAME* в клетках линии K562 приводил к снижению скорости пролиферации и активации сигнальных путей, ответственных за миелоидную дифференцировку [19]. Активность *PRAME*, что было доказано нокаутом этого гена, связана также с блокированием дифференцировки клеток меланомы A375. В ксенографтной модели наблюдалось замедление скорости роста клеток A375, вызванное действием ретиноевой кислоты [13, 20, 88]. Более того, трансфекция гена *PRAME* человека в клетки мышинной меланомы B16 также приводила к блокированию их дифференцировки и потере чувствительности к ретиноевой кислоте [88]. Таким образом, *PRAME* связан с нечувствительностью опухолевой клетки к блокированию пролиферации, опосредованной ретиноевой кислотой.

*Иммортализация.* Известно о взаимодействии между *PRAME* и комплексом белков EKS/KEOPS [29]. Комплекс EKS/KEOPS эволюционно крайне консервативен, и практически в неизменном виде обнаруживается в организмах всех эукариот независимо от таксонов. EKS/KEOPS выполняет множество функций, главная из которых – поддержание стабильности теломерных повторов



[21]. Компоненты этого комплекса активны во всех клетках человека и продолжают функционировать в опухоли. Нужно отметить, что участие белка PRAME в поддержании длины теломер ещё не было доказано. Взаимодействие между PRAME и EKS/KEOPS остаётся единственным косвенным свидетельством.

*Опухоль-ассоциированное воспаление.* Согласно наблюдениям Wadelin et al., экспрессия PRAME может запускаться сигнальным путём NF-κB при воздействии бактериального липополисахарида и интерферона-гамма на клетку [33]. Подобные условия обычны для локального воспаления. Теоретически хроническое воспаление может приводить к постоянному наличию белка PRAME в нормальной клетке. PRAME-позитивная здоровая клетка может приобрести дополнительные генетические дефекты и выжить по причине уменьшения вероятности развития апоптоза. В результате выживает мутантная клетка, которая может стать опухолевой. Подобная связь воспаления и PRAME не противоречит известным данным о развитии опухоли в результате непроходящего воспаления [22]. С другой стороны, во многих случаях опухоль находится в воспалительном окружении [23]. Поступающие извне сигналы активируют NF-κB, что может стимулировать активность PRAME в опухолевой клетке. Поскольку PRAME поддерживает пролиферацию, скорость роста опухоли увеличивается, и реакция воспаления также не прекращается. Вследствие этого активность PRAME не затухает, вместе с чем не отменяются PRAME-опосредованные эффекты, оказываемые на опухоль.

*Изменения морфологии/локомоции клеток, а также инвазия и метастазирование.* При исследовании увеальной меланомы глаза было установлено, что наибольшая активность гена PRAME наблюдается в метастазах, в то время как в первичном опухолевом очаге уровень экспрессии значительно ниже [56]. У больных остеосаркомой, меланомой на стадии метастазирования, опухолями яичников, а также раке головы и шеи в метастазах и поражённых лимфатических узлах активность PRAME выше, чем в первичной опухоли [24, 52, 61, 75]. При остеосаркоме экспрессия PRAME сопровождается потерей молекул адгезии CNTN1, VEGF, PCDHB9, B4GALT5, GRIN2C, NGFB, SLC12A3, IDUA, THBS4, TSPAN5, SCRG1, EPHB2 и ISLR [59]. Установлена связь гиперэкспрессии

*PRAME* с инвазией и метастазированием при раке печени [12]. *PRAME* стимулировал инвазию и миграцию клеток рака молочной железы и поддержал эпителиально-мезенхимальный переход путём активации виментина и снижения уровня экспрессии E-кадгерина [25, 83]. Всё это подтверждает непосредственное участие белка *PRAME* в метастазировании.

*Блокирование дифференцировки.* *PRAME*-опосредованное блокирование дифференцировки опухолевых клеток наблюдалось многими исследователями. В ряде случаев была выявлена ассоциация между гиперэкспрессией *PRAME* с опухолями, обладающими сравнительно меньшей степенью дифференцировки, как например при опухоли Вильмса [26, 62], меланоме [88], острых лейкозах [19] и при семиноме [27]. Как упоминалось выше, трансфекция клеток геном *PRAME* приводила к нечувствительности к факторам, опосредующим дифференцировку, а после нокаута гена *PRAME* наблюдали эффекты отмены блока дифференцировки. *PRAME* связан с блокированием дифференцировки не только опухолевых клеток. Так, этот белок подавляет SOX17-опосредованную программу дифференцировки герминогенных клеток [27]. Мышиный гомолог *PRAME* поддерживает состояние плюрипотентности эмбриональных клеток и стимулирует их быстрое деление [89]. Таким образом, собрано множество свидетельств блокирования дифференцировки опухолевой клетки, вызванных экспрессией в ней гена *PRAME*.

Мы показали, что практически все перечисленные признаки, характерные для опухолевой клетки, могут усиливаться в условиях экспрессии белка *PRAME*. Ещё один значимый признак – это *избегание иммунного распознавания*. Эпитопы белка *PRAME* распознаются иммунной системой, что не является преимуществом для *PRAME*-экспрессирующей клетки. Известные данные об обратной корреляции экспрессии *PRAME* и компонентов главного комплекса гистосовместимости при саркомах объясняются не наличием регуляторной связи между белком *PRAME* и генами, кодирующими эти компоненты, а отрицательной селекцией, проводимой самой иммунной системой больного [28]. Таким образом, существует только один признак *PRAME*-экспрессирующей опухолевой клетки, который вносит

благоприятный вклад в течение заболевания. Этот признак – иммуногенность опухолевой клетки.

Разумеется, в ряде наблюдений установлена только корреляция между высоким уровнем экспрессии *PRAME* и большей выраженностью обсуждаемых признаков опухоли. Но множество исследовательских групп проводило эксперименты по нокауту и трансфекции гена *PRAME*, после которого наблюдались изменения в этих признаках. Объём этих наблюдений позволяет сделать вывод о том, что между экспрессией *PRAME* и проявлением признаков опухолевой клетки существует прямая причинно-следственная связь, причём *PRAME* является драйвером, формирующим их.

### **1.3. Клиническое значение экспрессии *PRAME* при солидных опухолях**

В отличие от большинства РТГ, ген *PRAME* обладает очень высокой частотой спонтанной активности. мРНК или белок *PRAME* могут быть обнаружены примерно у каждого второго больного солидными опухолями [35]. Для некоторых локализаций характерна почти стопроцентная встречаемость транскриптов *PRAME*. При иных онкологических заболеваниях экспрессия *PRAME* встречается очень редко, что может объясняться различиями в спектре активных транскрипционных факторах. В основном исход заболевания у *PRAME*-позитивных больных хуже по сравнению с *PRAME*-негативными больными с таким же диагнозом или стадией заболевания.

Ikeda et al., открывшие ген *PRAME*, выполнили большую работу по определению частоты встречаемости мРНК при различных онкологических заболеваниях. Согласно их данным, наибольшая частота экспрессии *PRAME* характерна для меланомы кожи. Транскрипты *PRAME* были обнаружены в 88% образцов первичных очагов опухоли и в 95% образцов метастазов меланомы [32]. Ikeda сделал вывод, что активность гена *PRAME* может быть связана метастазированием данного заболевания. Причиной активности могло быть деметилирование генома, в частности промотора *PRAME*. Наблюдения и выводы Ikeda et al. были подтверждены в последующем, когда стали применять более продвинутые методы детекции мРНК. Согласно двум более современным

исследованиям, что транскрипты *PRAME* могут быть обнаружены у 86% [54] или у 84,6% пациентов в первичном очаге меланомы [55]. Было высказано предположение, что в некоторых случаях при меланоме не происходит активации гена *PRAME*. Однако остаётся неизвестным, какие у этого есть причины, и как это влияет на прогноз при меланоме.

В отличие от меланомы кожи, значение экспрессии гена *PRAME* при увеальной меланоме установлено более однозначно. Ikeda et al. исследовали 9 образцов данной опухоли, и обнаружили мРНК *PRAME* в 5 из них. Эти данные были подтверждены позднее, причем не только в контексте мРНК, но и на уровне белка. Westekemper et al. определяли интенсивность экспрессии белка *PRAME* при помощи антител. Экспрессия была выявлена как в самих тканях глаза, так и в метастазах увеальной меланомы, а также в лимфатических узлах, поражённых опухолевыми клетками [56]. Гистологические срезы образцов метастазов увеальной меланомы окрашивались интенсивнее, чем первичный очаг опухоли, что может свидетельствовать о связи между активностью *PRAME* и метастазированием [56]. Интересно, что *PRAME*-распознающие антитела предпочтительно связывались с ядрами опухолевых клеток. Однако активность *PRAME*, выявленная иммуногистохимически, не коррелировала с ответом на терапию или временем выживаемости больных. Следует помнить, что метод ИГХ по сравнению с ПЦР менее чувствительный, и небольшие отличия в уровне экспрессии белка могут быть не различимы. Методы ПЦР-исследования и транскриптомного анализа позволили получить больше сведений об особенностях увеальной меланомы. Так, данные транскриптомного анализа позволили установить, что для данного заболевания характерно два возможных паттерна экспрессии генов. Один из них соответствует классу I увеальной меланомы, который связан с относительно благоприятным прогнозом. Напротив, молекулярному классу II увеальной меланомы соответствует неблагоприятный прогноз. При детальном исследовании было установлено, что молекулярный класс I может быть разделён по уровню экспрессии гена *PRAME* на случаи с высоким уровнем, и на остальные, с низким уровнем или без экспрессии вообще [53].

Установлено, что у больных увеальной меланомой, чья опухоль относится к молекулярному классу I с высоким уровнем экспрессии гена *PRAME* риск метастазирования выше по сравнению с больными, имеющими тот же молекулярный класс, но со сниженным уровнем экспрессии *PRAME* [57].

При ретинобластоме исследовалось влияние *PRAME* на химиорезистентность опухоли. Было проведено сопоставление профиля экспрессии генов в образце опухоли, полученном перед химиотерапией, с двумя образцами, полученными после химиотерапии, и двумя образцами нормальной глазной ткани. Дополнительно методом ИГХ был исследован 21 образец опухоли. Анализ экспрессии генов показал, что активность гена *PRAME* в образцах, резистентных к химиотерапии, увеличена. Результаты ИГХ-исследования, однако, не подтвердили эти данные. Трансфекция вектора для экспрессии гена *PRAME* в клетки линий ретинобластомы Y79, ATCC и USA привела к снижению их чувствительности к таким химиопрепаратам как карбоплатин, винкристин и этопозид [58].

При остеосаркоме активность *PRAME* в опухолевой клетке наблюдается чаще по сравнению с какими-либо ещё РТГ [59]. Среди больных остеосаркомой мРНК *PRAME* была выявлена в 96,4% случаях [60]. В опухолевой клетке белок *PRAME* блокирует активность NOTCH-сигналинга, а также связан с утратой молекул адгезии. Кроме этого, снижена способность *PRAME*-экспрессирующих клеток остеосаркомы к дифференцировке [60, 61]. Скорость деления клеток линий остеосаркомы U-2OS и ZOS падала при нокауте *PRAME*. Помимо этого, клетки U-2OS и ZOS после нокаута образовывали меньше колоний. Причиной могло быть увеличение активности P27, который отвечает за остановку клеточного цикла в фазе G1. Возможно, белок *PRAME* блокирует P27, но данный вопрос никогда специально не рассматривался. При исследовании опухолевых образцов, полученных от больных, установлено негативное влияние высокого уровня экспрессии *PRAME* на время выживаемости больных, а также ассоциация с более продвинутыми стадиями заболевания [61].

Миксоидная и круглоклеточная липосаркома составляют примерно одну треть всех случаев липосаркомы. Белок *PRAME* и его мРНК экспрессировались во всех исследованных образцах опухоли, и на очень высоком уровне, за исключением низкодифференцированной липосаркомы, при которой наблюдается очень низкий уровень экспрессии гена [63]. Следует отметить, что именно высокодифференцированная липосаркома имеет наихудший прогноз. Метод ИГХ показал, что *PRAME* и другой раково-тестикулярный белок NY-ESO-1 были активны в 90% и 89% образцов опухоли, полученных от больных миксоидной липосаркомой. Высокий уровень экспрессии *PRAME* коррелировал с большим размером опухоли, наличием в ней участков некроза, числом круглых клеток >5% в опухоли, более продвинутой стадией, а также худшими параметрами общей (ОВ) и бессобытийной выживаемости (БСВ) [64].

По сравнению с меланомой и липосаркомой при раке почки активность *PRAME* наблюдается реже. Ikeda et al. показали, что *PRAME* экспрессируется у 41% больных раком почки. Согласно другим исследованиям – у 40% [65] и 39% [66] исследованных больных. Гиперэкспрессия *PRAME* оказалась связана со светлоклеточным раком почки [35], но не связана со стадией и с экспрессией генов группы *MAGE* или других РТГ [67]. В случае экспрессии *PRAME* опухоль была резистентной к терапии ИТК [68].

Известны данные об экспрессии *PRAME* при самой распространённой опухоли у детей до 15 лет – при нейробластоме. Чем больше был возраст больных и чем более продвинутая стадия наблюдалась, тем выше был и уровень экспрессии *PRAME* в опухоли. Было выделено три возможных уровня экспрессии *PRAME* – высокий, средний и низкий или нулевой. Генетические аномалии, вовлекающие ген *MYC*, никогда не обнаруживались в случаях низкого уровня экспрессии *PRAME*. Параметры БСВ и ОВ были хуже у больных с большим уровнем экспрессии по сравнению больными, имеющими средний и низкий/нулевой уровень активности этого гена (БСВ 0,45 vs 0,71 vs 0,92, соответственно,  $p=0,03$ ; ОВ 0,77 vs 0,86 vs 1,0, соответственно,  $p=0,1$ ). В тех случаях, когда *PRAME* не экспрессировался в дебюте

заболевания, в течение трех лет наблюдения у больных не происходило рецидива или прогрессии [48].

Анализ на микрочипах показал, что в опухолевых клетках медуллобластомы активны 30 генов, которые не функционируют в здоровых тканях головного мозга. *PRAME* был одним из таких генов [69]. Экспрессия *PRAME* наблюдалась в образцах опухоли 84% больных, но не коррелировала ни со стадией, ни со временем выживаемости больных [70].

Активность *PRAME* исследовалась в образцах опухоли гипофиза. Транскриптомный анализ показал, что *PRAME* совместно с генами *CD24*, *POU4F2* и *HOXD13*, может быть маркером промежуточной дифференцировки опухоли гипофиза [71]. В работе было рассмотрено всего три случая, и связь с клиническими параметрами не была исследована.

В опухоли больных раком мочевого пузыря *PRAME* экспрессируется не так часто, как при меланоме. В одном из исследований было выявлено только 20% больных с экспрессией *PRAME* в опухоли [36]. В другом исследовании установлено, что таких больных было примерно 32% [72]. Была описана прямая связь между экспрессией гена *PRAME* и большим размером опухоли [36, 72]. По данным Lerut et al., экспрессия *PRAME* наблюдается чаще при начальных стадиях заболевания [72]. Напротив, Dyrskjot et al. сообщают, что *PRAME* активен в более продвинутых стадиях, что сопровождается также резистентностью терапии ( $p=0,02$ ). Несмотря на это уровень экспрессии не был связан с изменениями в параметрах ОБ [36].

Активность *PRAME* исследовалась при плоскоклеточном раке головы и шеи. Среди больных с данным диагнозом экспрессия *PRAME* была обнаружена, согласно двум источникам, в 42% и в 49% случаев [73, 74]. Гиперэкспрессия на уровне белка или мРНК чаще характерна для более продвинутых стадий. Наблюдалась ассоциация экспрессии с другими РТГ и с курением в анамнезе [73-75]. Клетки опухоли, поразившие «сторожевые» лимфатические узлы, также имели белок *PRAME* [73]. Интересно, что активность *PRAME* в этих клетках была наивысшей по сравнению с клетками, выделенными из первичного опухолевого

очага и других метастазов [75]. Наблюдаемые особенности воспроизводились и на клеточных линиях. Так, в линии клеток рака головы и шеи PCI-1, имеющей высокий уровень дифференцировки, было обнаружено меньшее количество белка PRAME по сравнению с линией PCI-13, имеющей низкий уровень дифференцировки [75]. Однако при данном заболевании не было установлено влияния PRAME на параметры выживаемости больных [73].

Достаточно большой объём сведений об экспрессии *PRAME* у больных раком лёгких. В целом экспрессия выявлялась у 32% больных. Так же, как и при опухолях головы и шеи, активность гена оказалась ассоциирована с курением [76]. Прогноз у больных с экспрессией *PRAME* был несколько лучше, чем у больных без экспрессии, хотя и статистически не значимо ( $p=0,39$ ). Имеются экспериментальные данные, которые свидетельствуют о возможной онкосупрессорной роли *PRAME* при раке лёгких. Модельные клетки линий PC9 и A549 рака лёгкого значительно быстрее пролиферировали после нокаута в них гена *PRAME* [77]. В экспериментах *in vivo* также было показано снижение количества опухолевых метастаз после нокаута *PRAME* [78]. В последовательности гена *PRAME* у больных раком лёгких были обнаружены различные нарушения. Основным видом таких аномалий были микроделеции, которые приводят к синтезу нефункционального белка. Эти микроделеции были обнаружены в 73% исследованных образцах опухоли [79]. Вероятно, в результате микроделеций белок *PRAME* не может взаимодействовать с другими белками, и не проявляет свои функции. При этом несмотря на потерю целых фрагментов в своей структуре белок остаётся иммуногенным, и опухолевые клетки становятся мишенью для опухолевых специфических Т-киллеров.

Клиническое значение экспрессии *PRAME* исследовалось также при раке молочной железы. Небольшой уровень экспрессии гена *PRAME* может наблюдаться в неопухолевых клетках молочной железы. Транскрипты гена *PRAME* были обнаружены в 37% образцов нормальной ткани. Однако в поражённой опухоли ткани *PRAME* экспрессируется чаще (в 53%) и на значительно более высоком уровне, чем в нормальной ткани. Установлено, что медиана ОБ при



экспрессии *PRAME* составила 7 лет. Медиана ОВ не достигалась, если в образцах опухоли не детектировалась активность *PRAME* ( $p=0,0052$ ). Многофакторный регрессионный анализ показал, что гиперэкспрессия *PRAME* является неблагоприятным прогностическим признаком ( $p=0,02$ ), не зависящим от чувствительности опухоли к эстрогену, наличием поражения в региональных лимфатических узлах, гистологическим типом опухоли и опухолевой массой [80]. Другое исследование подтвердило неблагоприятное прогностическое значение экспрессии *PRAME* при раке молочной железы. Медиана ОВ больных с экспрессией *PRAME* была достигнута через 12 лет, в то время как медиана выживаемости больных без экспрессии не была достигнута к концу 18-летнего срока наблюдения ( $p<0,001$ ) [81]. Различия в наблюдаемом времени выживаемости больных может объясняться особенностями методики детекции транскриптов *PRAME*, когда разными лабораториями были выбраны разные пороговые уровни для распределения больных по группам для наблюдения. Транскриптомный анализ, выполненный для 1145 генов в образцах, полученных от 414 больных, показал, что мРНК генов *PRAME* и *CEGP1* являются лучшими биомаркерами негативного прогноза для рака молочной железы [82]. Несмотря на вполне однозначные результаты клинических наблюдений, роль *PRAME* в патогенезе рака молочной железы остаётся малопонятной и противоречивой. Так, нокаут *PRAME* в линиях рака молочной железы снижал долю клеток, находящихся в апоптозе, но увеличивал скорость метастазирования в экспериментах *in vivo* [83].

Определение уровня экспрессии *PRAME* применяют также для уточнения субтипов фиброэпителиальных новообразований молочной железы. Фиброаденома и листовидная опухоль молочной железы представляют собой предраковые состояния, морфологически трудно отличимые. Транскриптомный анализ позволил выделять пять генов: *PRAME*, *APOD*, *ABCA8*, *CCL19* и *FN1*, определение которых можно использовать для дифференциальной диагностики. Клетки фиброаденомы имеют повышенный уровень экспрессии генов *APOD*, *ABCA8* и *CCL19*. При листовидной опухоли эти гены имеют обычный уровень экспрессии,

тогда как активность генов *FNI* и *PRAME* увеличена по сравнению с нормальной тканью [84].

Известно также о клинической значимости экспрессии *PRAME* при семиноме. Данное заболевание развивается из мужских половых клеток. Для нормальных гамет также характерно наличие транскриптов и белка *PRAME*. В процессе их трансформации уровень экспрессии *PRAME* значительно увеличивается. Имеются подтверждения, что белок *PRAME* для сеиномы является драйвером [97]. При нокауте *PRAME* в клетках сеиномы TCam-2 уровень экспрессии гена *SOX17*, ответственного за дифференцировку герминогенных клеток, оставался стабильным. Одновременно снижался уровень экспрессии генов *LIN28*, *PRDM14* и *ZSCAN10*, поддерживающих плюрипотентность [27].

Активность гена *PRAME* наблюдалась также у больных раком яичников. Доля больных с *PRAME*-экспрессирующей опухолью составила 60% [98]. В качестве одной из причин высокого уровня экспрессии называют амплификацию гена. Прогностическое значение при данном заболевании оказалось противоречивым. У больных, находящихся на III стадии, гиперэкспрессия в дебюте заболевания прямо связана со снижением времени выживаемости [91, 99]. Уровень экспрессии *PRAME* не различался в выборке выживших и погибших III и IV стадиями, наблюдавшихся более 5 лет [100]. Амплификация локуса гена *PRAME* оказалась связана с незначительным увеличением времени ОВ [40]. Диагностическое значение экспрессии *PRAME* оказалось более однозначным. Выявление транскриптов удобно для дифференциальной диагностики серозной карциномы и мезотелиомы яичника. При серозной карциноме *PRAME* экспрессируется, а при мезотелиоме этот ген не активен [52].

Таким образом, от заболевания к заболеванию частота встречаемости активного *PRAME* бывает разной. Прогностическое значение экспрессии во многих случаях негативное (Таблица 1).

**Таблица 1** – Частота наблюдения PRAME-позитивных случаев и прогностическое значение экспрессии PRAME при солидных опухолях

Заболевание	Публикация, и доля PRAME-экспрессирующих случаев, %	Влияние на прогноз больных
Меланома первичная	[32] 88%, [55] 84,6%,	Не установлено
Меланома метастатическая	[32] 95%, [54-81], 86%,	Не установлено
Увеальная меланома	[56]	Не установлено
Ретинобластома	[58]	Химиорезистентность [58]
Остеосаркома	[59] 96,4% [60, 61]	Потеря дифференцировки и блокирование NOTCH-сигналинга [59]
Опухоль Вильмса	[61]	Потеря дифференцировки
Липосаркома	[63, 64] 90%	Неблагоприятное [64]
Рак почки	[32] 41%, [65] 40%, [66] 39%	Неблагоприятное [35]
Нейробластома	[48] 93%	Неблагоприятное [48]
Медуллобластома	[69, 70] 84%	Нет [70]
Опухоль гипофиза	[71]	Нет [71]

Заболевание	Публикация, и доля PRAME-экспрессирующих случаев, %	Влияние на прогноз больных
Рак мочевого пузыря	[36] 20%, [72], 32%	Неблагоприятное, опосредовано резистентностью к химиотерапии [36]
Плоскоклеточный рак головы и шеи	[73] 42%, [74] 49%	Потеря дифференцировки [75], метастазирование [73]
Аденокарцинома лёгких	[45] 32%	Благоприятное [47]
Рак молочной железы	[80] 37%,	Неблагоприятное [80-82]
Семинома		Неблагоприятное [27, 97]
Рак яичников	[98] 60%	Неблагоприятное [91, 99], Нейтральное [100], Благоприятное [40]

#### 1.4. Клиническое значение экспрессии *PRAME* при онкогематологических заболеваниях

В достаточно большом числе работ исследовалась частота спонтанной экспрессии *PRAME* и её влияние на прогноз при лимфопролиферативных заболеваниях – В-клеточных лимфомах и лейкозах, острых лейкозах и других онкогематологических заболеваниях. Хотя подобные заболевания составляют относительно небольшую долю среди онкологических заболеваний в целом, интерес к значению экспрессии *PRAME* у таких больных всегда был очень высоким.

Интерес обусловлен по меньшей мере двумя причинами. Одной из них может быть относительно большая доступность клеток хронических или острых лейкозов

для исследования. По сравнению с тканями солидных опухолей, забор костного мозга и тем более крови провести легче, чем выполнить биопсию. Кроме этого, образцы костного мозга и крови не требуется гомогенизировать перед выделением РНК для исследования, тогда как ткани солидных опухолей зачастую заливаются в парафиновый блок, и только в таком виде передаются для исследования. Другой, более важной причиной представляется относительно раннее внедрение в клиническую практику первых лекарственных антител, таких как ритуксимаб, эксперименты с другими иммунопрепаратами, и опыт трансплантации ГСК. Достижение и поддержка длительной ремиссии после проведения трансплантации с самого начала объяснялась иммунными причинами. Для исследования механизмов иммунного ответа искали опухоль-специфические антигены, и очень быстро обратили внимание на РТГ, в том числе на *PRAME*. И если Ikeda опубликовал работу об открытии *PRAME* в 1997 году, то результаты первого масштабного исследования активности этого гена при лимфопролиферативных заболеваниях и острых лейкозах были опубликованы группой van Baren et al. в 1998 году.

Полученные данные о влиянии на прогноз при онкогематологических заболеваниях во многом сопоставимы с тем, что наблюдалось при исследовании солидных опухолей. Но есть особенности, которые ещё требуют объяснения.

#### **1.4.1. Прогностическое значение экспрессии *PRAME* при лимфопролиферативных заболеваниях**

Уже в девяностые годы был накоплен большой опыт проведения высокодозной химиотерапии и трансплантации ГСК при множественной миеломе (ММ). Однако практически всегда развивались рецидивы заболевания. При рецидиве эффект трансплантат-против-опухоли мог быть усилен за счёт инфузии лимфоцитов донора или посредством терапии ИЛ-2. В обоих случаях наблюдается высокая токсичность в отсутствие миелома-специфичного ответа. Перед выполнением аллогенной трансплантации даже проводили предварительную иммунизацию донора иммуноглобулином, наработанным клеткой миеломы больного. У донора развивался специфический антиидиотипический ответ,

который сохранялся и у реципиента после трансплантации. Очищенным антителом также иммунизировали самих больных ММ. Однако терапия была успешна только у небольшой группы больных. По этой причине стали искать новые антигены клеток миеломы, которые могли бы усилить иммунный ответ против них. Активный *PRAME* был обнаружен достаточно быстро. Оказалось, что его экспрессия наблюдается чаще при более развёрнутых стадиях [101]. В костном мозге больных ММ *PRAME* обладал большим уровнем экспрессии, чем в крови тех же больных [102].

При одновременной экспрессии менее, чем 6 из 14 РТГ, в числе которых был *PRAME*, медиана ОВ больных была статистически значимо выше (24 месяца против 7,  $p=0,0062$ ), чем у пациентов с экспрессией большего числа генов. Кокс-регрессионный анализ показал, что данные прогностические факторы были независимыми. Однако уровень экспрессии *PRAME* как отдельный фактор не имел прогностической значимости [103].

Терапия по протоколу VAD (винкристин, доксорубин, дексаметазон) была более эффективной, если у больных не экспрессировался *PRAME* ( $p=0,06$ ) [104]. При терапии, не включавшей бортезомиб, гиперэкспрессия *PRAME* была незначимо связана со снижением двухлетней ОВ ( $p=0,071$ ). Внедрение препарата бортезомиб сразу же увеличило результативность терапии при ММ. У больных, имеющих высокий уровень экспрессии *PRAME*, показатели двухлетней ОВ статистически значимо улучшились, если терапия включала бортезомиб ( $p=0,027$ ). Интересно, что прогноз у *PRAME*-негативных больных ММ не изменился в зависимости от того, включала терапия бортезомиб, или нет [105].

Методы определения мРНК *PRAME* использовались для разработки тестов для определения минимальной остаточной болезни при ММ. Если после трансплантации ГСК у больных сохранилась активность *PRAME* в костном мозге, ОВ этих больных была меньше, чем у остальных, и увеличивалась вероятность развития рецидива. Таким образом, присутствие мРНК *PRAME* в костном мозге больных ММ свидетельствует о наличии остаточной популяции опухолевых клеток в костном мозге [106].

При ММ исследовалась возможность развития гуморального ответа против антигена PRAME. В крови и плазме 195 больных ММ, большинство из которых к моменту исследования прошли аллогенную трансплантацию ГСК, не было обнаружено PRAME- и MAGEA-распознающих антител. Только у 5 пациентов в прогрессии заболевания выявили антитела к NY-ESO-1, и у 6 больных в ремиссии – антитела к SSX-2. Авторы предположили, что выработка антител не произошла по причине недостаточной активности Th2-клеток у больных [107].

При В-клеточном хроническом лимфоидном лейкозе (В-ХЛЛ) *PRAME* чаще активен в более продвинутых стадиях [108]. Поскольку ген *PRAME* находится в локусе  $\lambda$ -цепи иммуноглобулина, некоторые исследователи предположили возможность потери аллеля *PRAME* у больных с В-ХЛЛ в тех случаях, когда произошла реаранжировка иммуноглобулиновых генов. У 15% исследованных больных В-ХЛЛ в регионе 22q11 была обнаружена делеция размером от 0,34 до ~1 мБ. Делеция всегда была связана с утратой генов *ZNF280A*, *ZNF280B*, *GGTLC2* и *PRAME*. У больных с этой делецией медиана уровня экспрессии *PRAME* была на порядок ниже. При биаллельной реаранжировки ген полностью утрачивался. Однако потеря гена не имела связи ни с одним клиническим признаком [109]. В другом исследовании были обнаружены делеции 22q11 у 17,5% больных В-ХЛЛ, но утрата аллеля *PRAME* происходила не во всех случаях с делецией [110]. Нужно отметить, что для В-ХЛЛ чаще характерна к-клональность опухолевых В-клеток, чем клональность по  $\lambda$ -цепи. Возможно, *PRAME* участвует в патогенезе данного заболевания, но его вклад в прогноз незначителен. Действительно, при В-ХЛЛ не выявили зависимости параметров ОБ и БСВ больных, а также результативности терапии в зависимости от уровня экспрессии *PRAME* [111].

Проверялась возможность оценки минимальной остаточной болезни при В-ХЛЛ с помощью детекции транскриптов *PRAME*. Arons et al. установили, что величина экспрессии *PRAME* напрямую связана с количеством лимфоцитов. По мере снижения уровня лимфоцитов при проведении терапии уровень экспрессии *PRAME* также падал [112]. Таким образом, детекция *PRAME* может использоваться как мониторинговый маркер при В-ХЛЛ.

При волосатоклеточном лейкозе (ВКЛ) *PRAME* экспрессировался реже и на меньшем уровне по сравнению с В-ХЛЛ [112]. Других исследований ВКЛ в контексте активности гена *PRAME* нет.

Для ряда В-клеточных лимфом значение экспрессии *PRAME* установлено лучше. Для лимфомы Ходжкина (ЛХ) наличие экспрессии *PRAME* в клетках опухоли негативно влияет на прогноз. Клеточные ЛХ L-1236, HDLM-2 и KM-H2, гиперэкспрессирующие *PRAME*, были значительно менее чувствительны к цисплатину, этопозиду и мелфалану, чем на линию L-540, в которой этот ген был значительно менее активен [113]. Инкубирование L-540 с 5'-азацитидином деметилировало её ДНК, что приводило к увеличению уровня экспрессии *PRAME*. Результатом подобного воздействия стало развитие резистентности к цисплатину, ретровитину и АТРА [114]. У больных ЛХ активность *PRAME* прямо коррелировала с меньшим временем ОБ и БСВ ( $p=0,0005$ ), большим возрастом и худшим соматическим статусом [115].

В случае экспрессии у больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой (ДВКЛ) ген *PRAME* усугубляет течение заболевания. Показатели БСВ у больных с экспрессией *PRAME* в клетках лимфомы были статистически значимо хуже, больных без экспрессии *PRAME* ( $p=0,0373$ ) [116]. Результативность терапии, проводимой по протоколу R-CHOP, и БСВ также снижались у *PRAME*-экспрессирующих больных по сравнению с *PRAME*-негативными больными ( $p=0,013$ ). Помимо этого, статистически незначимо уменьшалось время ОБ ( $p=0,159$ ) больных ДВКЛ с экспрессией *PRAME* [117].

Уровень экспрессии гена *PRAME* у больных мантийноклеточной лимфомой (МКЛ) был выше, чем у больных В-ХЛЛ [118]. Согласно нашим собственным данным, при МКЛ *PRAME* активен чаще, чем при фолликулярной лимфоме (ФЛ), ДВКЛ и лимфоме из клеток маргинальной зоны [119]. Корреляция экспрессии *PRAME* с уровнем лейкоцитов, наличия опухолевых конгломератов, стадии по Ann-Arbor и соматического статуса у больных МКЛ не наблюдалось ни в одной из работ [118, 120]. При МКЛ, как и при В-ХЛЛ, в 2 из 28 случаях обнаружили



гетерозиготную делецию локуса гена *PRAME*. Причиной этому могла быть перестройка генов  $\lambda$ -цепи иммуноглобулина [120].

Известны упоминания об экспрессии *PRAME* в линиях Т-клеточных лимфом SU-DHL-1 и NuT78 [121]. На клиническом материале экспрессия *PRAME* при Т-клеточных лимфомах не исследовалась.

#### **1.4.2. Активность *PRAME* при хроническом миелоидном лейкозе и миелодиспластическом синдроме**

Различают три стадии течения хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ). Это длительная хроническая фаза (ХФ), при которой заболевание протекает относительно медленно и отличается незначительными клиническими проявлениями. В течение несколько лет заболевание может перейти в фазу акселерации (ФА), когда увеличивается количество миелобластных клеток и базофилов и снижается количество тромбоцитов, а также появляются дополнительные цитогенетические аномалии. На данной фазе усугубляются симптомы заболевания. Довольно быстро ФА, по сравнению с ХФ, трансформируется в бластный криз (БК) – состояние, напоминающее острый лейкоз. На этой стадии ХМЛ прогрессирует очень быстро, и вероятность гибели больного наиболее высокая. Эти стадии заболевания различаются клинически и требуют разных подходов для ведения больного. Для разработки новых терапевтических подходов и сбора дополнительных данных о патогенезе ХМЛ проводился транскриптомный анализ образцов обогащенных клеток ХМЛ. Результаты этого анализа показали, что паттерн экспрессии генов в ФА и БК во многом сопоставимы, и радикально отличается от паттерна экспрессии генов при ХФ [30]. Фактически, ХМЛ протекает в две стадии на молекулярном уровне. При ХФ драйвером опухоли является химерная тирозинкиназа BCR-ABL, утратившая способность к спонтанной инактивации, и постоянно активирующая клеточный цикл. С некоторой вероятностью BCR-ABL меняет эпигенетическую регуляцию экспрессии остальных генов, в том числе таких как РТГ и *PRAME*, в частности. После этого, когда запускаются другие регуляторы клеточного цикла, начинается вторая стадия, которая на клиническом уровне соответствует ФА и БК. Уровень

экспрессии РТГ быстро увеличивается. При этом BCR-ABL становится не единственным драйвером, а одним из многих, вследствие чего ХМЛ всё меньше отвечает на терапию ИТК [122]. Этому есть дополнительное подтверждение, полученное при исследовании больных раком почки. В случае экспрессии *PRAME* в опухоли, терапия, основанная на использовании ИТК, менее результативна [68].

Применение ИТК иматиниба или понатиниба, не влияет на уровень экспрессии гена *PRAME* [122, 123]. Если ХМЛ в стадии ХФ теряет чувствительность к иматинибу, в лейкозных клетках часто увеличивается активность гена *PRAME*. Поскольку *PRAME* обладает потенциалом драйвера канцерогенеза, его появление может сделать клетку ХМЛ полностью независимой от белка BCR-ABL, что может стать причиной неудачи применения ИТК. Действительно, было замечено, что сначала увеличивается активность *PRAME*, а потом начинает нарастать число лейкозных клеток. Таким образом, начало экспрессии *PRAME* опосредует постепенную потерю чувствительности к ИТК служит ранним предиктором прогрессии заболевания [30].

Поскольку и *PRAME*, и *BCR-ABL* экспрессируются в одной и той же опухолевой клетке при ХМЛ, их совместная детекция может применяться для оценки эффективности терапии и определения минимальной остаточной болезни [124]. В случае успеха терапией ИТК количество обоих транскриптов постепенно снижается, пока не перестаёт детектироваться [108, 124].

Потеря чувствительности к ИТК у некоторых больных ХМЛ может происходить вследствие приобретения лейкозной клеткой свойств ГСК. Такие клетки находятся в состоянии покоя, и не реагируют на применение ИТК. Предполагалось, что иммуногенность белка *PRAME* позволит проводить иммунотерапию против таких клеток. В одном из исследований собрали CD34<sup>+</sup> клетки больного ХМЛ и оценили активность в них гена *PRAME* и других генов, активность которых часто ассоциирована с лейкозами. Белки PR3, SURVIVIN и hTERT экспрессировались на сопоставимом уровне в CD34<sup>+</sup> клетках больных ХМЛ и ГСК, выделенных у здоровых добровольцев. Транскрипты гена *PRAME* не обнаруживались, или выявлялись в очень небольшом количестве в нормальных

ГСК. В отличие от ГСК, CD34<sup>+</sup> клетки больных, находящихся в стадии ХФ и БК ХМЛ обладали высоким уровнем экспрессии *PRAME* [125]. Были также собраны данные, свидетельствующие, что BCR-ABL<sup>+</sup> CD34<sup>+</sup> клетки экспрессируют молекулы главного комплекса гистосовместимости. Вследствие этого возможна презентация эпитопов белка PRAME и уничтожение таких клеток системой иммунитета [124].

Таким образом, проведение трансплантации аллогенных ГСК больным ХМЛ может приводить к развитию реакции трансплантат-против-опухоли [123]. Действительно, аллогенная трансплантация и инфузии лимфоцитов донора в случае рецидива обладают значительной клинической эффективностью [124]. Но собственная иммунная система больного тоже может сформировать специфический ответ. У больных, достигших ответа на ИТК, в крови обнаружено много активированных НК-клеток. Количество миелоидных супрессоров и T-регуляторных клеток (Treg) такое же, как у здоровых людей. В других случаях, когда терапия ИТК оказывается малоэффективной, это оказалось связано с повышенным уровнем миелоидных супрессоров, Treg и экспрессии PD-1 на T-киллерах. Исследователи предположили, что в дебюте заболевания популяция клеток ХМЛ быстро пролиферирует. Одновременно возникает иммунная толерантность к этим клеткам. В случае успеха терапии ИТК лейкозные клетки погибают, и клетки-супрессоры больше не могут с ними взаимодействовать, за счёт чего толерантность утрачивается. Оставшиеся лейкозные клетки подвергаются атаке со стороны иммунной системы. У 42% больных, быстро ответивших на терапию ИТК, были обнаружены PRAME-специфические CD8<sup>+</sup> клетки. Среди не леченых больных только у 10% были найдены такие клетки [126]. Таким образом, противоопухолевый иммунный ответ не менее важен для сохранения полной ремиссии ХМЛ, чем терапия ИТК.

У больных миелодиспластическим синдромом (МДС) активность *PRAME* установлена как неблагоприятный фактор. Экспрессия этого чаще наблюдалась при возникновении хромосомных аномалий. В более продвинутых стадиях промотор *PRAME* чаще подвергался деметилированию. Медиана ОБ у больных со

сниженным уровнем метилирования была меньше (12 мес), чем у больных с нормальным уровнем метилирования (25 мес,  $p=0,026$ ). Вычисление уравнения множественной линейной регрессии показало, что статус метилирования промотора *PRAME* представляет собой независимый фактор прогноза [127].

Экспрессия гена *WT1* отличается неблагоприятным значением для прогноза у больных МДС. По сравнению с *PRAME*, экспрессия *WT1* происходит реже. Одновременное увеличение уровня экспрессии *PRAME* и *WT1* либо только гена *PRAME* в костном мозге больных МДС свидетельствовало о наступающей прогрессии заболевания [128].

Известно также наблюдение группы Liberante et al. о прогностическом значении уровня экспрессии *PRAME* при МДС. Выборку больных распределили по уровню экспрессии этого гена и оценили параметры выживаемости. Оказалось, что у 25% больных с наиболее низким уровнем экспрессии, а также у 25% с самым высоким уровнем экспрессии *PRAME* в выборке были наихудшие параметры ОВ, чем у остальных больных, имеющих относительно средний уровень экспрессии ( $p=0,009$  и  $p=0,005$ , соответственно). Авторы предположили, что в случае низкого уровня экспрессии *PRAME* опухолевые клетки не распознаются иммунной системой. Случаи высокого уровня экспрессии соответствуют наличию крупной популяции трансформированных клеток. Наконец, случаи со средним уровнем экспрессии *PRAME* характеризуются присутствием относительно небольшой популяции опухолевых клеток, но при этом экспрессирующих *PRAME* на достаточно высоком уровне, чтобы их могли распознать специфические Т-киллеры [129]. Ни в одном другом заболевании не было обнаружено, что существует некий «средний» уровень экспрессии *PRAME*, при котором клинический исход отличается от случаев с очень высоким или очень низким уровнем экспрессии.

#### **1.4.3. Активность и значение экспрессии *PRAME* при детских острых лейкозах**

Интересной особенностью острых лейкозов у детей является ассоциация экспрессии *PRAME* с относительно благоприятным прогнозом.

При В-клеточных острых лимфоидных лейкозах (ОЛЛ) детей наличие транскриптов гена *PRAME* в костном мозге ассоциировано с более низким уровнем лейкоцитов, лучшими параметрами БСВ ( $p < 0,05$ ) [130, 131] и большим временем ОВ ( $p = 0,039$ ) [132]. В группе больных без неблагоприятных хромосомных aberrаций риск развития рецидива и параметры ОВ и БСВ также были лучше в случае экспрессии *PRAME* ( $p < 0,05$ ) [132]. Уровень экспрессии *PRAME* при рецидиве ОЛЛ оставался таким же, как и в момент начала терапии [130]. Как и у больных МДС, при В-ОЛЛ ген *PRAME* был активен чаще, чем ген *WT1* [131].

При Т-клеточных ОЛЛ детей *PRAME* также экспрессировался, но не влиял на результаты лечения [132].

При острых миелоидных лейкозах (ОМЛ) у детей уровень экспрессии *PRAME* в крови и костном мозге был сопоставим [133]. При высоком уровне экспрессии количество лейкоцитов и бластных клеток было меньшим. Гиперэкспрессия *PRAME* чаще наблюдалась у больных без хромосомных аномалий, и у больных с перестройкой  $t(8;21)$  ( $p = 0,021$ ) [134, 135]. При нормальном кариотипе экспрессия *PRAME* наблюдалась либо на низком уровне, либо вообще не детектировалась [134]. Показатели БСВ были лучше в случаях *PRAME*-экспрессирующего ОМЛ ( $p < 0,05$ ). Показатели ОВ у больных без прогностически благоприятных хромосомных перестроек также были несколько лучше ( $p = 0,13$ ) [136].

Ген *PRAME* признан наилучшим мониторинговым маркером минимальной остаточной болезни, так как его транскрипты встречаются только в лейкозных клетках [133]. У больных, находящихся в ремиссии, количество мРНК *PRAME* соответствовало количеству, характерному для здоровых добровольцев [133]. Если во время терапии активность *PRAME* не снижалась, риск развития рецидива становился выше [137]. Активность *PRAME* у больных в рецидиве имела такой же уровень, как и в дебюте заболевания [133, 134]. Трансплантация ГСК снижала экспрессию *PRAME* до неопределяемого уровня. Обычно экспрессия *PRAME* детектировалась снова за два с половиной месяца до развития рецидива [134].

Установлено также, что *PRAME* является идеальным молекулярным развитием острого мегакариоцитарного лейкоза у детей с синдромом Дауна [138].

#### **1.4.4. Активность и значение экспрессии *PRAME* при острых лейкозах взрослых**

При ОЛЛ взрослых активность *PRAME* в значительной ассоциирована с наличием филадельфийской хромосомы, сохраняющейся в лейкозной клетке в результате трансформации заболевания из ХМЛ [139]. Наибольшие уровни экспрессии *PRAME* наблюдаются при наличии хромосомных перестроек [140].

При достижении полной ремиссии ОЛЛ взрослых активность *PRAME* становится неопределимой. Замечено, что повторное выявление мРНК *PRAME* является ранним предиктором развития рецидива [140, 142]. В дебюте заболевания и в рецидиве активность *PRAME* у взрослых больных ОЛЛ наблюдается на сопоставимом уровне [11].

У взрослых больных ОМЛ *PRAME* экспрессируется в целом чаще, чем у больных ОЛЛ ( $p < 0,05$ ) [140, 141]. Предполагается, что экспрессия *PRAME* может экспрессироваться на разном уровне в лейкозных клетках, полученных от одного и того же больного [139, 142]. При высоком уровне экспрессии *PRAME* антиген CD15 на лейкозных клетках активен реже, а CD33 – чаще [140, 141].

Параметры ОВ больных острым промиелоцитарным лейкозом были лучше в группе с высоким уровнем экспрессии *PRAME* ( $p = 0,031$ ). Риск развития рецидива у таких больных также снижен ( $p = 0,103$ ) [143]. Согласно нашим собственным данным, детекция *PRAME* на уровне менее 5% относительно *PML-RAR $\alpha$*  является фактором высокого риска раннего рецидива ( $p = 0,0231$ ) [119].

У больных ОМЛ с нормальным кариотипом низкий уровень экспрессии гена *PRAME* был связан со снижением времени ОВ ( $p = 0,035$ ) и БСВ ( $p = 0,017$ ) и с резистентностью к терапии [144]. В группе больных старше 60 лет *PRAME* был активен чаще при наличии благоприятных цитогенетических аномалий, но не влиял на параметры ОВ [145].

Количество мРНК *PRAME* в пробах костного мозга больных ОМЛ снижается, если проводимая терапия эффективна. Когда экспрессия *PRAME* не

детектировалась в ремиссии во время проведения мониторинга, рецидивы не развивались [139, 141, 146]. Обнаружение транскриптов гена *PRAME* и увеличении его уровня экспрессии во время ремиссии обычно происходило за несколько недель до развития рецидива [142, 146].

### 1.5. Парадоксальность *PRAME*

При солидных опухолях и злокачественных лимфомах, течение которых связано с формированием плотных образований опухолевых клеток, активность *PRAME* ухудшает прогноз. Возможно, в этом случае иммуногенность белка не делает клетки рака или лимфомы уязвимыми, так как многослойная структура опухоли защищена от литического воздействия *PRAME*-специфичных CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Помимо этого, имеет значение *PRAME*-опосредованная резистентность опухолевых клеток к проводимой химиотерапии [36, 58, 113, 116, 147].

Экспрессия *PRAME* у больных ХМЛ связана с прогрессированием и ухудшением прогноза. Негативную роль экспрессии *PRAME* можно объяснить иммуносупрессией [126] и способностью белка блокировать дифференцировку клеток путём супрессии сигналинга ретиноевой кислоты [88]. Негативный эффект экспрессии *PRAME* может усугубляться снижением экспрессии активатора апоптоза *TRAIL* [10]. Но если рассмотреть результаты экспериментов с линией K562, клетки которой были получены от больной, находящейся в стадии БК ХМЛ, значимость *PRAME* при ХМЛ покажется парадоксальной. Для K562 характерен очень высокий уровень экспрессии *PRAME*, вследствие чего они использовались как положительный контроль во многих исследованиях [32, 112, 133, 148, 149, 150, 151, 146]. Tanaka et. al. и Yan et. al. проводили нокаут экспрессии *PRAME* в этой линии. После нокаута пролиферация клеток K562 замедлилась и в культуральной среде, и в ксенографтных моделях [8, 11]. Авторы предположили, что *PRAME* усиливает пролиферативную активность лейкозных клеток, а его нокаут, соответственно, подавляет. Однако Tajeddine et. al., Oehler et. al. и Xu et. al. наблюдали увеличение скорости роста клеток линии K562 после нокаута *PRAME*, причём как в культуре, так и в ксенографтной модели [15, 149, 152]. При экспрессии *PRAME* увеличивается активность гена *TP53* за счёт снижения уровня экспрессии

его супрессора, гена *S100A4* [149, 153]. Наконец, Oehler et. al. оценивали эффекты нокаута *PRAME* в клетках, полученных от трёх больных ХМЛ, находящихся в стадии БК. В одном из случаев скорость пролиферации клеток увеличилась, но не изменилась в двух других [15].

В отличие от лимфом и ХМЛ, активность *PRAME* у больных острыми миелоидными лейкозами оказалась благоприятным фактором. Вероятно, это вызвано большей доступностью циркулирующих в крови лейкозных клеток для иммунной атаки. При ОМЛ не наблюдается *PRAME*-опосредованного снижения уровня экспрессии гена *TRAIL* [19]. Но результаты экспериментов с клеточными линиями не упрощают объяснение позитивного значения экспрессии *PRAME* при острых миелоидных лейкозах. Клетки KG1 после трансфекции геном *PRAME* медленнее росли, хуже формировали колонии, а интенсивность каспаза-3-независимого апоптоза в них увеличилась [19, 149, 152]. Однако клетки HL60 и NB4 после трансфекции геном *PRAME* увеличили скорость пролиферации [15]. Кроме этого, значимым может быть *PRAME*-опосредованное блокирование дифференцировки клеток. Доказано, что *PRAME* является блокатором сигналинга ретиноевой кислоты, и его присутствие может приводить к тем же эффектам, что и наличие в клетке белков PML-RAR $\alpha$  и PLZF-RAR $\alpha$  [88]. Негативный эффект, вызванный блоком дифференцировки, может быть нивелирован включением ATRA (all trans retinoic acid) в протоколы терапии больных ОМЛ. Действительно, ATRA позволила добиться лучших результатов терапии в группе *PRAME*-гиперэкспрессирующих больных по сравнению с остальными [19].

Таким образом, эффекты экспрессии *PRAME* во многом оказываются линейно-специфичными. Вполне возможно, что функции *PRAME*, лишённого собственного каталитического домена, зависят от белков, с которыми он образует комплекс. Интересно, что трансфекция *PRAME* нормальных CD34<sup>+</sup> клеток не повлияла на скорость их пролиферации, хотя и блокировала их дифференцировку в сторону гранулоцитов при помощи ATRA [15]. CD34<sup>+</sup> клетки не трансформировались, так как для них не был характерен белковый контекст лейкозных клеток, в котором мог бы быть задействован *PRAME*. В связи с этим,



клинический исход у PRAME-экспрессирующих больных может быть различным, и зависит от характера заболевания (Таблица 2).

**Таблица 2** – Экспрессия *PRAME* и её прогностическое значение при различных онкогематологических заболеваниях

Заболевание	Публикация, и доля <i>PRAME</i> -экспрессирующих случаев, %	Влияние на прогноз больных
Здоровые, кровь	[154] 0, [14] 0, [139] 0, [134] 30, [118] 2, [155] 0, [138] 0, [141] 7, [133] 5, [108] 1, [112] 8	Нет
Здоровые, костный мозг	[154] 0, [101] 0, [34] 0, [139] 0, [134] 33, [133] 9, [156] 0, [103] 0, [15] 0, [123] 0, [145] 0, [157] 7	Нет
Здоровые, CD34+ клетки	[34] 0, [155] 0, [138] 0, [15] 0, [123] 0	Не установлено
Острые миелоидные лейкозы	[32] 33, [34] 59, [155] 64, [148] 67, [141] 30, [142] 40, [145] 53, [140] 41, [157] 48	Благоприятное [119, 143, 144]
Острые миелоидные лейкозы с нормальным кариотипом	[146] 55	Благоприятное [144]
Острые миелоидные лейкозы, дети	[134] 62, [133] 65, [142] 41, [135] 82, [150] 55, [158] 31	Благоприятное [136]
Острые лейкозы, Ph-	[14] 0, [139] 50	Неблагоприятное [123]
Острые лейкозы, Ph+	[14] 100, [139] 84	Не установлено
ОМЛ, M0	[154] 11, [139] 50,	Не установлено
ОМЛ, M1	[154] 24, [139] 16, [157] 33	Не установлено
ОМЛ, M2	[154] 63, [139] 45, [157] 56	Не установлено

Заболевание	Публикация, и доля <i>PRAME</i> -экспрессирующих случаев, %	Влияние на прогноз больных
ОМЛ, М3	[154] 64, [139] 75, [15] 83, [157] 60	Не установлено
ОМЛ, М4	[154] 25, [139] 50, [157] 46	Не установлено
ОМЛ, М5	[154] 13, [139] 0, [157] 25	Не установлено
ОМЛ, М6	[154] 43, [139] 50	Не установлено
ОМЛ, М7	[154] 0, [139] 0, [138] 100	Не установлено
ОЛЛ	[141] 17, [157] 37	Не установлено
В-ОЛЛ	[154] 20	Не установлено
В-ОЛЛ, дети	[130] 42, [142] 35	Благоприятное [130-132]
Т-ОЛЛ	[154] 0, [139] 50	Не установлено
ОМЛ билинейный	[154] 7	Не установлено
ХМЛ, ХФ	[122] 7, [14] 0, [139] 23, [30] 42, [108] 20, [124] 58, [156] 36, [15] 50, [123] 28, [157] 13	Неблагоприятное [30]
ХМЛ, ФА	[122] 28, [14] 50, [139] 29, [30] 17, [123] 50, [157] 40	Не установлено
ХМЛ, БК	[122] 80, [14] 100, [139] 64, [141] 33, [30] 32, [108] 22, [124] 70, [156] 70, [15] 97, [123] 67, [157] 80	Не установлено
МДС	[128] 74	Неблагоприятное [127-129]
В-ХЛЛ	[118] 16, [159] 18, [112] 27	Неблагоприятное [108]
ВКЛ	[154] 0, [112] 8	Не установлено
ММ, общее	[106] 69, [104] 62, [154] 22, [102] 60, [139] 0, [103] 23, [105] 46	Неблагоприятное [104-106]

Заболевание	Публикация, и доля PRAME-экспрессирующих случаев, %	Влияние на прогноз больных
ММ, ст 1	[101] 11	Не установлено
ММ, ст 3	[101] 56	Не установлено
ЛХ	[119] 22, [154] 14	Неблагоприятное [115]
не-ЛХ	[119] 31, [154] 15, [139] 23, [118] 44	Не установлено
ДВКЛ	[116] 38, [117] 32	Неблагоприятное [116, 117]
МКЛ	[119] 44, [159] 57	Не установлено

#### 1.6. Активность *PRAME* у пациентов онкологическими заболеваниями в России

Данные литературы о частоте обнаружения *PRAME*-позитивных случаев среди больных показывают, что активация данного гена может происходить при любых онкологических заболеваниях, хотя и с разной частотой. В некоторых случаях она близка к 100%, в иных может не превышать 20% от исследованной выборки. Поскольку было опубликовано достаточно много результатов подобных исследований, мы провели их сопоставление с данными о распространения онкологических заболеваний в России в 2015 году [160] для того, чтобы оценить масштаб исследуемой проблемы. Всего был зарегистрирован 589381 случай. При оценке примерного количества *PRAME*-экспрессирующих больных в России мы не рассматривали больных с такими локализациями опухолей, которые не упоминались в литературе в контексте экспрессии *PRAME*. По этой причине было рассмотрено 256605 случаев с диагнозами, для которых была ранее опубликована информация об активности *PRAME*. Для каждой из нозологий мы рассчитали возможное число *PRAME*-позитивных случаев (Таблица 3), после чего сложили эти числа. Таким образом, численность больных с возможной экспрессией *PRAME*

составила 126137, или приблизительно 49% всех больных, для которых можно прогнозировать данную величину.

**Таблица 3** – Данные о больных, зарегистрированных к 2015 году

Заболевание/ локализация	Число больных	Активность <i>PRAME</i> , доля в популяции, %	Предполагаемое число <i>PRAME</i> - экспрессирующих больных
Рак головы и шеи	24849	49 [74]	12176
Рак яичников	14049	60 [98]	8429
Трахея, бронхи, лёгкое	60351	32 [161]	19312
Кости и суставные хрящи	1503	96 [32]	1443
Меланома кожи	10236	95 [64]	9724
Соединительная и другие мягкие ткани	3611	90 [80]	3250
Молочная железа	67189	53 [65]	35610
Почка	22846	41 [72]	9367
Мочевой пузырь	16012	32 [56]	5124
Глаз и его придаточный аппарат	1053	56 [48]	590
Головной мозг и другие отделы ЦНС.	8896	93 [102]	8273
Лимфома Ходжкина	3223	22 [117]	709
Неходжкинские лимфомы	9276	50 [102]	4638
Множественная миелома	3622	60 [139]	2173
Острые лимфолейкозы	1752	84 [114]	1472
Другие лимфолейкозы	4035	27 [155]	1089

Заболевание/ локализация	Число больных	Активность <i>PRAME</i> , доля в популяции, %	Предполагаемое число <i>PRAME</i> - экспрессирующих больных
Острые миелоидные лейкозы	1902	64 [122]	1217
Хронические миелоидные лейкозы и миелосаркома	2200	70 [122]	1540
Всего больных	256605		126137
Остальные нозологии	332776	Не изучена	

Поскольку со временем заболеваемость онкологическими заболеваниями увеличивается [162], мы провели оценку возможного распространения активного *PRAME* для новых случаев, зарегистрированных в течение 2015. Число новых случаев с локализациями, при которых ранее исследовали активность *PRAME*, составила 256568. Согласно данным литературы, экспрессия *PRAME* может наблюдаться в 127033 случаях, или примерно 49%. Таким образом, доля больных с возможной экспрессией *PRAME* практически не различалась между популяцией больных, выживших к 2015 году, но обладающих любым стажем заболевания, и тех больных, которые были поставлены на онкологический учёт только в 2015 году, с высокой долей вероятности обладающих незначительным стажем заболевания (Таблица 4).

Разумеется, реальная встречаемость *PRAME*-позитивных случаев может отличаться от предсказанной уже потому, что исследования, на которых базируется прогноз, выполнены при помощи разных методов определения, обладающих разной чувствительностью. Но лучшей основы для прогноза нет, так как не существует стандарта для определения активного мРНК и белка *PRAME*, и тем более, не проводили тотального скрининга населения. Кроме этого, в 2015 году в

России наблюдалось ещё 332776 онкологических больных с такими локализациями, для которых экспрессия PRAME не была исследована.

**Таблица 4** – Данные о больных с диагностированными онкологическими заболеваниями в 2015 году

Заболевание/локализация	Мужчины	Женщины	Активность PRAME, доля в популяции, %	Предполагаемое число PRAME-экспрессирующих больных
Рак головы и шеи	19878	4971	49 [74]	12176
Рак яичников		14049	60 [98]	8429
Трахея, бронхи, лёгкое	48139	12212	32 [160]	19312
Кости и суставные хрящи	792	711	96 [59]	1443
Меланома кожи	3976	6260	95 [32]	9724
Соединительная и другие мягкие ткани	1715	1896	90 [64]	3250
Молочная железа		66621	53 [80]	35309
Почка	12518	10328	41 [65]	9367
Мочевой пузырь	12368	3644	32 [72]	5124
Головной мозг и другие отделы ЦНС	4377	4519	56 [56]	8273
Лимфатическая и кроветворная ткань	13011	14583	53 [102, 112, 117, 139, 155]	14625
Всего	116774	139794		127033

### 1.7. Опыт терапии PRAME-экспрессирующих злокачественных новообразований

Белок PRAME не имеет ферментативного центра и известных белков-субстратов, очень трудно разработать специфический низкомолекулярный

ингибитор. Более простым подходом представляется таргетная иммунотерапия. Свидетельства такой возможности следуют уже из первой публикации о PRAME. Сначала были выделены CD8-положительные лимфоциты, атакующие клетки меланомы, а потом был определён эпитоп, распознаваемый этими Т-клетками, и наконец, найден ген, кодирующий белок, содержащий данный эпитоп [32]. Кроме этого, высокая иммуногенность PRAME улучшает результаты адъювантной терапии. Ретроспективный анализ результатов терапии больных раком молочной железы показал, что адъювантная терапия улучшает клинический исход у пациенток, опухоль которых экспрессировала PRAME [80, 81]. В группе больных, не получивших адъювантную терапию, исход заболевания у PRAME-положительных пациенток был хуже, чем у PRAME-негативных [80, 81].

Значительное количество работ, обзор которых дан выше, были посвящены поиску клинически значимых молекулярных маркеров, а также оценке распространённости активного PRAME у больных для разработки протоколов иммунотерапии. Но некоторые работы посвящены непосредственно этим методам. К настоящему времени (февраль 2021 года) в литературе упомянуты различные подходы.

Известны попытки использовать дендритноклеточные вакцины для презентации эпитопов белка PRAME лимфоцитам больного. Для создания вакцины Morandi et al. создали дендритные клетки, нагруженные тотальной РНК клеток нейробластомы. Эти дендритные клетки инкубировали с обогащёнными CD8-положительными клетками здоровых доноров и больных нейробластомой. После нескольких раундов культивирования были отобраны популяции Т-киллеров, распознающих и уничтожающих клетки-мишени. В качестве мишеней использовались PRAME-экспрессирующие клетки нейробластомы и лейкозные клетки T2, в которые заранее были помещены пептиды белка PRAME [163].

Разрабатывалась и проверялась эффективность дендритноклеточной вакцины для терапии саркомы Юинга. Altwater et al. при стимулировании PRAME-презентирующими дендритными клетками смогли обогатить популяцию Т-лимфоцитов, лизирующих PRAME-положительные клетки. Однако получить такой

клон удалось только от двух из 14 больных саркомой Юинга и у одного из 20 здоровых доноров. Авторы предположили, что при саркоме Юинга Т-клеточный ответ против PRAME развивается редко, и рекомендовали разработку химерного Т-клеточного рецептора для трансфекции в неспецифические Т-лимфоциты [164].

Стоит упомянуть и о другом возможном способе иммунотерапии нейробластомы. Показано, что НК-клетки стимулируют экспрессию молекул HLA-A2 на поверхности клеток нейробластомы, что улучшает PRAME-зависимый Т-клеточный ответ против них [165].

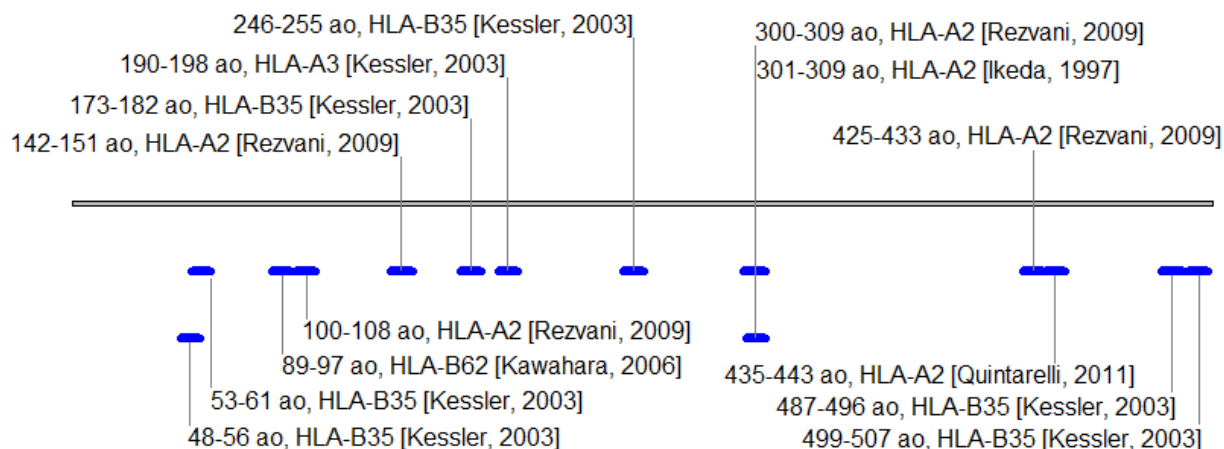
Другой подход иммунотерапии предусматривает использование PRAME-распознающих Т-киллеров. Клетки могут быть получены посредством презентирования пептидов PRAME при помощи антиген-презентирующих клеток (АПК). Подход может быть результативным при использовании таких пептидов, презентруемых АПК, которые обладают наибольшим сродством к молекулам HLA. К сожалению, немедленно возникают ограничения, связанные с тем, что в человеческой популяции распространены разные молекулы HLA, лишь немногие из которых представлены у заметной доли представителей. В генотипе европейцев, например, распространены изотипы -A2 и -B35 молекулы HLA (приблизительно у 50% и 20% населения, соответственно). В связи с этим разные авторы специально проводили поиск наиболее эффективно презентруемых пептидов белка PRAME, связывающихся с различными молекулами HLA.

Проведение подобного поиска возможно благодаря особенностям формирования комплекса пептид-молекула HLA. Известно, что молекула HLA класса I закрыта с двух сторон и может ассоциироваться с пептидами длиной от 8 до 11 аминокислотных остатков. Чем сильнее связь пептид-HLA, тем выше иммуногенность белка, имеющего данный эпитоп. Некоторые аминокислотные остатки этих пептидов консервативны, вследствие чего эпитопы можно предсказывать при математическом моделировании [166].

Наиболее иммуногенными эпитопами PRAME оказались пептиды VLDGLDVLL (занимает позицию 100-108 в белке PRAME, или PRA100), SLYSFPEPEA (PRA142), ALYVDSLFFL (PRA300), SLLQHLIGL (PRA425) и



NLTHVLYPV (PRA435). Эти эпитопы процессируются и распознаются в комплексе с молекулой HLA-A0201 [167, 168] (Рисунок 3).



**Рисунок 3** – Карта эпитопов белка PRAME

С молекулой HLA-B35 могут связываться следующие пептиды PRAME: LPRELFPPPL(F) (PRA48), FPPLFMAAF (PRA53), RPRRWKLQV (PRA113), IPVEVLVDLF (PRA173), LPTLAKFSPY (PRA246), CPHCGRDTFY (PRA488), EPILCPCFM (PRA500) [169].

Установлено, что с молекулой HLA-B62 связывается пептид GQHLHLETF, [170] и с молекулой HLA-A3 связывается пептид ELFSYLIEK (PRA190) [171].

Большое разнообразие иммуногенных эпитопов PRAME делает этот белок очень привлекательным для терапии. При сопоставлении иммуногенности PRAME и BCR-ABL, характерного для хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ), последний показал очень низкую иммуногенность. Объясняется это тем, что BCR-ABL образован двумя неиммуногенными белками, экспрессирующимися в соматических тканях человека. Лишь в месте слияния белков BCR и ABL находится единственный потенциальный эпитоп, новый для иммунной системы носителя [172]. Однако другие раково-тестикулярные антигены, такие как MAGE-A3, SSXIP2, HAGE, реже, по сравнению с PRAME, вызывают Т-клеточный иммунный ответ [34, 147, 160, 173, 174].

Белок PRAME может расщепляться не только протеасомами, но также пептидазами nardilysin и TOP. Таким образом, ингибиторы протеасом, такие как

бортезомиб, не могут полностью блокировать презентацию эпитопов PRAME при терапии PRAME-экспрессирующих опухолей. Это может быть полезно при планировании терапии, включающей бортезомиб [171].

Для прогнозирования результативности иммунотерапии терапии Babiak et al. определяли частоту развития спонтанного Т-клеточного ответа против PRAME у больных раком лёгких. Т-клетки, распознающие пептид 300-309 PRAME, были найдены в крови у 8/14 больных. Пептиды PRAME распознавались Т-клетками таких больных чаще, чем антигены RHAMM, WT1, hTERT, сурвивин, MAGE-A3, G250, HER2 и Aurora kinase A и B [160]. Таким образом, выделение Т-лимфоцитов больного, распознающих PRAME, кажется перспективным.

Однако выделение специфических лимфоцитов не всегда бывает успешным. В одной из ранних работ из крови больных меланомой выделили Т-клетки для презентации им пептидов белка PRAME 100-108, 142-151, 300-309 и 425-433 при помощи специально наработанных АПК. Популяции специфических Т-клеток были получены, но в результате распознавание PRAME-экспрессирующих клеток проходило с меньшей интенсивностью, чем в экспериментах с контрольными пептидами вируса гриппа и PAX5 [175]. Лишь прибегнув к деметилирующим агентам в концентрациях, близких к IC50, удалось примерно вдвое повысить уровень экспрессии *PRAME* в клетках-мишенях, и увеличить литическую активность [175]. В другой работе при помощи дендритных клеток, нагруженных пептидом 300-309 PRAME, вывели популяцию Т-клеток, распознающих клетки хондромиосаркомы [176]. Лизис происходил на низком уровне, но мог быть усилен при помощи азацитидина [176].

В крови человека как здорового, так и больного онкологическим заболеванием, может циркулировать незначительное количество наивных Т-лимфоцитов, имеющих низкоаффинный PRAME-распознающий рецептор. Подобные клетки могут быть выделены, но будут обладать низкой литической активностью против клеток-мишеней.

Однако кровь человека – не единственная доступная среда, содержащая Т-клетки. Группа Zhang et al. получила интересные результаты по выведению Т-

лимфоцитов из лимфатических узлов, дренирующих опухоль больных меланомой. Из этих Т-лимфоцитов выводили клоны, распознающие пептиды PRAME. Клетки были введены мышам, которым перед этим привили PRAME-экспрессирующие клетки меланомы человека. В результате удалось добиться контроля над ростом опухоли. Авторы проверяли различные комбинации клонов и клеток опухолей и определили, что наилучшие результаты терапии мышей достигаются при полном соответствии молекул HLA привитой опухоли и клона Т-клеток [177].

Учитывая технологическую сложность наработки Т-лимфоцитов *in vitro*, привлекательным способом кажется вакцинирование больных для появления этих клеток непосредственно в организме. Опубликованы результаты клинического исследования по вакцинированию пептидами PRAME и PSA 26 больных меланомой, раком почки и раком простаты, чьи клетки опухоли имеют соответствующие антигены. Все больные были в продвинутых стадиях, получили стандартную терапию без успеха либо находились в прогрессии. Вакцинация предусматривала введение ДНК-векторов для экспрессии фрагментов пептидов 422-509 PRAME, 3-45 PSA и 217-297 PSA в «сторожевые» лимфатические узлы, а также введение HLA-A0201-презентируемых пептидов 425-433 PRAME и 288-297 PSA. Ни в одном случае не удалось достигнуть ремиссии. 10 из 24 больных демонстрировали стабилизацию заболевания, и 7 из них оставались стабильными в течение 6 месяцев от начала терапии. В эту группу вошли 4 из 10 исходных больных раком простаты, 2 из 2 больных раком почки и 1 из 10 больных меланомой [178].

Вакцина на основе полноразмерного рекомбинантного белком имеет преимущества по сравнению с пептидной вакциной. Полноразмерный белок содержит полный набор эпитопов, свободно процессируется в АПК и может служить основой для развития всех необходимых В- и Т-клеток. В настоящее время проходит испытания вакцина, разработанная компанией GlaxoSmithKline. Первые результаты доклинических исследований были обнадеживающими. Рекомбинантный PRAME в сочетании с адъювантом AS15 использовали для вакцинации мышей. Через две недели после четвертого введения у мышей был

обнаружен высокий титр антител против PRAME, который оставался стабильным в течение следующих шести недель. Иммунизированные мыши оставались здоровыми после прививки им мышинной опухоли CT26, экспрессирующей человеческий белок PRAME (CT26-PRAME). Мыши контрольной группы погибли вследствие развития опухоли. Ответ против другой опухоли, CT26-MAGE-A3, после применения PRAME и AS15 был незначительным. Иммунизация обезьян продемонстрировала безопасность созданной вакцины. У животных развился стабильный CD4-зависимый и гуморальный ответ [179].

Вакцина на основе рекомбинантного белка PRAME прошла первую фазу клинических испытаний у 60 больных с диагнозом немелкоклеточный рак лёгкого [180] и 66 больных меланомой [55]. В этих исследованиях оценивали безопасность применения различных доз белка – по 20, 100 и 500 мкг, а также характер развившегося иммунного ответа. Каждый больной получил по 12 введений. Результаты этих клинических испытаний в целом были сопоставимы. В большинстве случаев у больных развивались CD4-положительные клетки, распознающие PRAME, причём их количество было тем выше, чем больше белка получал больной при иммунизации. В плазме всех больных после иммунизации были обнаружены антитела, связывающиеся с PRAME. Наблюдаемые побочные эффекты усиливались напрямую в зависимости от количества белка, но позволяли использовать максимальную дозировку белка во второй фазе клинических испытаний. Однако ни у одного больного не развился CD8-зависимый ответ [180]. Вторая стадия клинического исследования иммунизации больных немелкоклеточным раком лёгкого была прервана в связи с тем, что параллельно идущее исследование эффективности вакцинации белком MAGE-A3 не дало результатов, превосходящих плацебо.

В завершение данного раздела приводим данные по клиническим исследованиям (КИ) таргетной терапии PRAME-экспрессирующих заболеваний. К настоящему времени (февраль 2021 года) все 34 зарегистрированных КИ на ресурсе [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), которые можно найти по ключевому слову «PRAME», посвящены либо испытаниям иммунопрепаратов, либо оценке наличия мишеней

для иммунотерапии больных в будущем. К настоящему моменту КИ вакцин на основе рекомбинантных белков полностью остановлены по причине низкой эффективности. Другие подходы, среди которых вакцинирование пептидами, дендритными клетками и введение CAR-T-клеток, по-прежнему тестируются (Таблица 5). Новые клинические исследования регистрируются всё чаще. Вероятно, нужно ожидать разработку новых способов терапии, таких как создание CAR-NK-клеточных вакцин против PRAME-экспрессирующих опухолевых заболеваний, либо разработки моноклональных антител.

**Таблица 5** – КИ методов иммунотерапии PRAME-экспрессирующих больных

Идентификатор КИ	Заболевание	Тип вакцины	Статус
NCT02743611	Метастатическая увеальная меланома, рецидив ОМЛ, МДС	ВРХ-701, аутологичные Т-киллеры, трансфицированные TCR, распознающим пептид PRAME в комплексе с молекулой HLA-A2	Активное, результаты не опубликованы
NCT01853878	Рак лёгких	Рекомбинантный белок PRAME, комбинация с адьювантом AS15	Прервано по причине низкой эффективности [180]
NCT01159964	Немелкоклеточный рак лёгких	Рекомбинантный белок PRAME, комбинация с адьювантом AS15	Прервано по причине низкой эффективности [180]

Идентификатор КИ	Заболевание	Тип вакцины	Статус
NCT01149343	Метастатическая меланома кожи	Рекомбинантный белок PRAME, комбинация с адъювантом AS15	Прервано по причине низкой эффективности [55]
NCT03503968	Миелоидные и лимфоидные неопластические заболевания	MDG1011, аутологичные Т-киллеры, трансфицированные TCR, распознающим пептид PRAME в комплексе с молекулой HLA-A2	Активное, проводится набор больных
NCT04262466	HLA-A2-позитивные PRAME-экспрессирующие опухоли	IMC-F106C, антигенраспознающий Т-клеточный рецептор, связывающий HLA-A2-рестрицированный пептид PRAME в комплексе с анти-CD3 доменом	Активное, набор больных ещё не открыт
NCT02405338	ОМЛ в ремиссии	WT1/PRAME-нагруженные аутологичные ДК	Активное, набор больных прекратился
NCT00423254	PRAME-экспрессирующие солидные опухоли	Синтетические пептиды PRAME и ПСА	Завершено, результаты не опубликованы

Идентификатор КИ	Заболевание	Тип вакцины	Статус
NCT04284228	ОМЛ и МДС	NEXI-001, CD8-положительные клетки донора, прошедшие экспансию в контакте с искусственными мини-ДК, презентующими 5 иммуногенных пептидов	Активное, идёт набор больных
NCT01734304	ОМЛ в ремиссии	Аутологичные ДК, нагруженные пептидами WT1, PRAME и CMVpp65	Завершено, результаты не опубликованы
NCT01333046	Лимфомы	Композиции из PRAME-, SSX-, MAGE-, NY-ESO- и сурвивин-специфичных CD8 <sup>+</sup> Т-лимфоцитов	Активное, идёт набор больных
NCT03686124	PRAME-экспрессирующие солидные опухоли	IMA203, аутологичные CART-клетки	Активное, идёт набор больных
NCT02876510	PRAME-экспрессирующие солидные опухоли	IMA101, аутологичные CART-клетки	Активное

Идентификатор КИ	Заболевание	Тип вакцины	Статус
NCT03652545	PRAME-экспрессирующие опухоли мозга	Аутологичные Т-клетки, прошедшие экспансию	Активное, идёт набор больных
NCT02239861	Рабдомиосаркома	Аутологичные Т-клетки, прошедшие экспансию	Активное
NCT03093350	Рак молочной железы	Аутологичные Т-клетки, прошедшие экспансию	Активное, идёт набор больных
NCT03192462	Рак поджелудочной железы	Аутологичные Т-клетки, прошедшие экспансию	Активное, идёт набор больных
NCT02291848	Множественная миелома	Аутологичные Т-клетки, прошедшие экспансию	Активное, идёт набор больных
NCT02750995	ОМЛ и МДС	Деметилирующие агенты и коктейль пептидов NY-ESO-1, PRAME, MAGE-A3 и WT-1	Активное, идёт набор больных
NCT02475707	ОЛЛ	Композиции из PRAME-, WT1- и сурвивин-специфичных CD8 <sup>+</sup> Т-лимфоцитов	Активное, идёт набор больных
NCT02494167	ОМЛ и МДС	Композиции из PRAME-, SSX-, MAGE-, NY-ESO- и сурвивин-специфичных CD8 <sup>+</sup> Т-лимфоцитов	Активное, идёт набор больных



Идентификатор КИ	Заболевание	Тип вакцины	Статус
NCT02203903	ОМЛ и МДС	Композиции из PRAME-, WT1- и сурвивин-специфичных CD8 <sup>+</sup> Т-лимфоцитов	Активное, идёт набор больных
NCT02789228	Солидные опухоли	Композиции из PRAME-, WT1- и сурвивин-специфичных CD8 <sup>+</sup> Т-лимфоцитов	Активное, идёт набор больных
NCT03318900	HLA-A2-позитивные PRAME-экспрессирующие опухоли яичников	Инфузии CD8 <sup>+</sup> Т-лимфоцитов донора и рекомбинантного ИЛ-2.	Активное, идёт набор больных
NCT02129075	Меланома	poly-ICLC, композиция из антигенов меланомы	Активное
NCT02042430	Опухоли яичников	Epacadostat, ингибитор индолиамина	Активное

### 1.8. Перспективы терапии PRAME-экспрессирующих опухолей

Строгая специфичность экспрессии *PRAME* в опухолевых клетках делает его хорошим маркером метастазирования или мониторинга минимальной остаточной болезни. Очень удобно разрабатывать и применять методы детекции мРНК *PRAME*, так как обладают большей разрешающей способностью, чем методы иммунодиагностики.

Особенности экспрессии *PRAME* открывают широкие возможности для иммунотерапии онкологических заболеваний. Против этого можно возразить тем,

что *PRAME* в опухоли экспрессируется гетерогенно, и *PRAME*-позитивные клетки опухоли могут быть перемешаны с *PRAME*-негативными [37]. Однако клинические данные показывают, что именно *PRAME*-позитивные клетки опухоли являются наиболее злокачественными. Даже если устранить только их, оставшиеся клетки будут менее резистентными к химиотерапии.

При некоторых *PRAME*-экспрессирующих онкологических заболеваниях благоприятное течение может объясняться развитием иммунного ответа против антигена и следующего за этим уничтожения клеток опухоли. Таким образом, оправдано разработка методов иммунотерапии против белка *PRAME*.

Вакцина, разработанная компанией GlaxoSmithKline, показала невысокую результативность. Согласно заключению самих исследователей, неуспех объясняется отсутствием  $CD8^+$  клеток, распознающих эпитопы *PRAME*. Возможно, для улучшения эффекта вакцинацию стоит сочетать с блокаторами PD-L1/2 для повышения вероятности появления специфических  $CD8^+$  клеток.

Ещё одна возможность, оставшаяся неиспользованной в настоящее время, заключается в добавлении ингибитора протеасом бортезомиба к уже разработанным схемам химиотерапии больных. Отмечая клинический успех применения бортезомиба при множественной миеломе, некоторые исследователи поднимали вопрос о его использовании для терапии больных солидными опухолями. Проводились экспериментальные работы по определению токсичности бортезомиба для клеток меланомы [181], рака молочной железы [182], рака предстательной железы [183] и других. В ряде случаев были достигнуты многообещающие результаты – токсичность бортезомиба наблюдали при дозировках в диапазоне 10-100 нМ. Более того, показано, что экспрессия белка *PRAME* не защищала клетки меланомы линии A375 от цитотоксического воздействия бортезомиба [20].

Кроме лабораторных экспериментов, бортезомиб применяли и в клинических исследованиях. Клиническая эффективность, однако, не превзошла достигаемой разработанными к моменту проведения испытаний схемами химиотерапии [184]. Данные, набранные к настоящему моменту, позволяют дать объяснение этим

неудачам. Прежде всего, действие бортезомиба быстро обратимо: протеасомы, заблокированные им, подвергаются клиренсу, и заменяются на новые, нормально функционирующие. Бортезомиб не провоцирует образование свободных радикалов и не повреждает ДНК. Механизм его цитотоксичности заключается в активации проапоптотических белков и ингибиторов клеточного цикла, блокаде сигнального пути NF-κB и накоплении повреждённых белков, что вызывает так называемый эндоплазматический шок [185]. Чем больше молекул бортезомиба попадает в цитоплазму клетки, тем более выраженным становятся эти эффекты. К сожалению, увеличивается токсичность по отношению не только к опухолевым клеткам, но и к здоровым. Вследствие этого, опухолевая клетка, не погибшая в результате воздействия бортезомиба, может восстановиться, что не приведёт к излечению болезни. И эта проблема не может быть решена увеличением дозировки. Однако есть возможность сочетания бортезомиба с другими химиопрепаратами. В тот момент, когда бортезомиб действует, опухолевая клетка потенциально становится более уязвимой к воздействию химиопрепаратов с другим механизмом действия. К сожалению, в большинстве перечисленных исследований бортезомиб применялся в монорежиме. По этой причине такое преимущество использования бортезомиба, как повышение уязвимости опухоли к другим воздействиям, осталось не реализованным.

Достигнутый уровень знаний позволяет увидеть в PRAME-опосредованном убиквитинировании белков уязвимость опухолевой клетки перед ингибиторами протеасом. Хотя субстраты, которые убиквитинируются белком PRAME, остаются неизвестными, можно предположить, что бортезомиб будет более эффективен против PRAME-позитивных опухолевых клеток. Действительно, опыт лечения больных множественной миеломой оказался особенно удачным в случае терапии PRAME-позитивных больных, общая выживаемость которых впервые в клинической практике оказалась сопоставима с таковой у PRAME-негативных больных [105]. Данный факт позволяет предположить, что бортезомиб будет также эффективен при его использовании для лечения PRAME-гиперэкспрессирующих

больных солидными опухолями, получающими при этом стандартную химиотерапию.

### 1.9. Заключение

Для многих онкологических заболеваний установлено прогностическое значение экспрессии *PRAME*. Интерес к белку PRAME как мишени для терапии также растёт, но пока достигнуты незначительные успехи. Значение белка в жизни человека остаётся малопонятным. Более того, PRAME остаётся непризнанным как драйвер онкогенеза. Ввиду отсутствия целостного взгляда на биологическое значение PRAME, представлялось целесообразным установить происхождение гена и эволюцию *PRAME*, прогнозировать модель регуляции его экспрессии, доказать свойства, способствующие канцерогенезу, и разработать подходы для терапии PRAME-экспрессирующих злокачественных новообразований.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

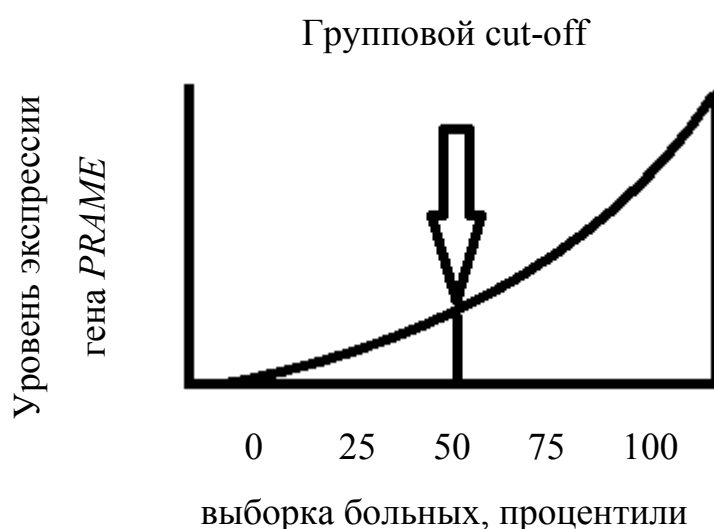
### 2.1. Клинический материал

#### 2.1.1. Определение прогностической значимости экспрессии гена *PRAME* при солидных опухолях биоинформатическими методами.

Были исследованы данные, доступные на сервисе GEPiA, для оценки влияния экспрессии *PRAME* на ОВ и БСВ больных онкологическими заболеваниями [186]. Были проанализированы данные 9065 больных со следующими диагнозами: аденокарцинома почки (АКР, n=77), рак мочевого пузыря (РМП, n=400), инвазивный рак молочной железы (РМЖ, n=1066), плоскоклеточный рак шейки матки и эндоцервикальная аденокарцинома (АКШМ, n=292), холангиокарцинома (ХК, n=36), рак толстой кишки (РТК, n=270), диффузная В-крупноклеточная лимфома (ДБКЛ, n=46), рак пищевода (РП, n=182), мультиформная глиобластома (МГ, n=156), плоскоклеточный рак головы и шеи (ПРГШ, n=518), хромофобный рак почки (ХРП, n=58), папиллярный рак почки (ПРП, n=517), светлоклеточная карцинома почек (СККП, n=283), острый миелоидный лейкоз (ОМЛ, n=106), глиома головного мозга (ГГМ, n=514), гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК, n=354), аденокарцинома легкого (АЛ, n=476), плоскоклеточный рак легкого (ПРЛ, n=383), мезотелиома плевры (МП, n=81), серозная цистаденокарцинома яичника (СЦАК, n=425), аденокарцинома поджелудочной железы (АКПЖ, n=178), рак предстательной железы (РПЖ, n=469), колоректальный рак (КР, n=90), саркомы мягких тканей (СМТ, n=256), меланома кожи (МК, n=459), рак желудка (РЖ, n=384), опухоли зародышевых клеток (ОЗК, n=136), рак щитовидной железы (РЩЖ, n=429), тимома (Т, n=118), рак эндометрия (РЭ, n=172), карциносаркома матки (КМ, n=56) и увеальная меланома (УМ, n=78). При оценке ОВ событием считалась гибель больного. При оценке БСВ событием считались прогрессирование заболевания либо рецидив и гибель от любых причин.

При анализе данных все больные в выборке были ранжированы согласно уровню экспрессии гена *PRAME* от случая, имеющего минимальный уровень, до случая с максимальным уровнем. Случай, находящийся у нулевого перцентиля,

имел минимальный уровень экспрессии *PRAME*, а случай, соответствующий сотому перцентилю, имел максимальный уровень. Далее выборки больных делили по перцентильям от 20 до 80 с шагом в 5 единиц, и проводили сравнение параметров выживаемости в полученных группах больных. Сравнение проводилось до тех пор, пока параметры выживаемости больных с большим уровнем экспрессии *PRAME* не приобретали наибольшую статистически значимую разницу по сравнению с остальными больными. В результате для исследованных больных мы установили пороговые значения, разделяющие выборки – так называемой групповой cut-off. На рисунке 4 представлен пример использования группового cut-off, с помощью которого выборка разделена на две группы. В одной из этих групп больных, составляющих 50% от выборки, уровень экспрессии *PRAME* выше, чем у любого из больных другой группы.



**Рисунок 4** – Подбор группового cut-off на уровне пятидесятого перцентиля

После этого оценивали, какой тип влияния оказывал высокий уровень экспрессии *PRAME* на выживаемость больных: было ли оно связано с неблагоприятными параметрами, благоприятными, либо не оказывало влияния. Если значения  $p$  были менее 0,05, связь уровня экспрессии с параметрами выживаемости оценивалась как статистически значимая. Если значения наблюдались в диапазоне  $0,05 \leq p \leq 0,1$ , мы признавали, что влияние уровня экспрессии *PRAME* на прогноз у больных имело тенденцию к статистической

значимости. Если значения  $p$  превосходили 0,1, влияние уровня экспрессии *PRAME* на прогноз признавали статистически незначимым.

Кроме данных о выживаемости больных мы проводили сопоставление активности гена *PRAME* с другими генами, данные о которых были найдены в системе GEPiA.

Для сравнения кривых выживаемости использовался лог-ранговый критерий. Вычисления производились при помощи инструментов, доступных в системе GEPiA.

### 2.1.2. Определение транскрипционных факторов

Для определения сайтов связывания транскрипционных факторов использовались данные, предоставленные в открытом доступе сервисом genomebrowser. [187, 188]

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3093116/pdf/1010.pdf>,

<http://www.jbc.org/content/288/48/34287.full.pdf>

### 2.1.3. Исследование эволюции генов группы *PRAME*

Были исследованы структуры генов семейства *PRAME* различных представителей класса млекопитающих. Кроме этого, были рассмотрены структуры локусов, содержащих гены семейства *PRAME* у данных организмов. Для отслеживания этапов эволюции генов, представленных в семействе *PRAME*, были определены положения других генов в этих локусах. Ввиду того, что семейство генов *PRAME* достаточно молодо, другие гены, представленные в тех же локусах, использовали в качестве маркеров, позволяющих проводить более точную систематизацию генов семейства *PRAME*.

Геномные последовательности для анализа были получены из баз данных, размещённых в системах pubmed и genomebrowser. Профиль экспрессии генов был получен из баз данных pubmed и TCGA [189]. Анализ взаимного расположения генов в локусах проводился с использованием инструментов genomebrowser. Сравнение последовательностей генов проводилось в программе Vector NTI 9.0.

### 2.1.4. Больные онкогематологическими заболеваниями

В исследование включено 34 больных фолликулярной лимфомой (ФЛ) (Таблица 6). Цитологические типы 1-2 были определены у 19 больных, 3a – у 8 больных и тип 3b – у 7. Поражение костного мозга подтверждалось гистологическим исследованием, определением В-клеточной клональности методом ПЦР или при иммунофенотипировании. Поражение костного мозга и лейкомизация крови подтверждали методами ПЦР или иммунофенотипированием. Диагноз ФЛ устанавливали на основании гистологического и иммуногистохимического исследований.

**Таблица 6** – клиническая характеристика больных фолликулярной лимфомой

Клинические параметры	Исследуемая группа, n=34
Мужчины	15 (44%)
Медиана возраста, лет	56 (34-79)
ECOG $\geq$ 2	20 (59%)
Цитологический тип 3	15 (44%)
Поражение более 1 экстранодальной области	28 (83%)
Поражение костного мозга	20 (59%)
В-симптомы	16 (48%)
Лактатдегидрогеназа, Е/л	450 (259-5398)
Стадии III и IV по Ann Arbor	30 (88%)
FLIPI-1, неблагоприятный риск	19 (55%)
FLIPI-2, неблагоприятный риск	18 (53%)

Для распределения больных по группам риска согласно критериям FLIPI-1 и FLIPI-2 определяли показатели уровня активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ), гемоглобина и  $\beta$ 2-микроглобулина, проводили определение максимального диаметра опухолевого лимфатического узла, оценивали количество поражённых зон и стадию заболевания по Ann-Arbor.

Лечение больных проводили по различным схемам, в том числе R-CHOP-21, R-CVP, R-DHAP и R-B.



Были исследованы больные Т-клеточными лимфопролиферативными заболеваниями, всего 36 больных, 19 мужчин и 17 женщин (Таблица 7).

**Таблица 7** – клиническая характеристика больных Т-клеточными лимфомами

Клинические параметры	Исследуемая группа, n=36
Мужчины	19 (53%)
Медиана возраста, лет	53 (18-81)
ECOG $\geq$ 2	20 (59%)
Поражение костного мозга	17 (48%)
Ki-67	65 (20-95)
Лактатдегидрогеназа, Е/л	612 (284-22000)
Стадии III и IV по Ann Arbor	31 (86%)

Медиана возраста – 53 года (18-81). У 4 – диагностирована ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома (АИТЛ); у 6 больных – периферическая Т-клеточная лимфома неспецифицированная (ПТЛН); у 4 – грибovidный микоз; у 7 – анапластическая Т-крупноклеточная ALK+ лимфома; у двух – синдром Сезари; у двух – Т-клеточный лейкоз из больших гранулярных лимфоцитов (БГЛ); у одного – первичная кожная гамма/дельта Т-клеточная лимфома; у одного – первичная кожная анапластическая крупноклеточная лимфома; у одного – Т-клеточная лимфома с цитотоксическим фенотипом; у одного – гепатолиенальная Т-клеточная лимфома; у одного – Т-клеточная лимфома, ассоциированная с энтеропатией; у одного – первичная кожная CD8<sup>+</sup> агрессивная эпидермотропная лимфома из цитотоксических Т-клеток; у одного – агрессивный NK/Т – клеточный лейкоз/лимфома – 1; у двух – Т-лимфобластный лейкоз/лимфома, неспецифицированная и у одного – Т-клеточный пролимфоцитарный лейкоз.

В связи с гетерогенностью нозологических форм больные получали различные протоколы терапии, поэтому их было трудно сгруппировать по признаку «одинаковый диагноз с одинаковой терапией». По этой причине мы

приводим только список протоколов терапии, которые использовались для лечения представленных больных: GMALL, SMILE, ALL-2009, NHL-BFM-90, TL-REZ-2008, интерферон, CHOP, ABVD и лучевая терапия. Трое больных получили аллогенную трансплантацию костного мозга, и 6 больных получили аутологичную трансплантацию.

Исследовалась влияние экспрессии гена *PRAME* на клинический исход у 77 больных множественной миеломой (ММ). Клиническая характеристика больных приведена в таблице 8. Из этих больных 46 были первичными, и 31 до проведения настоящего исследования проходили терапию по протоколам PAD (бортезомиб, доксорубин, дексаметазон), VCP (бортезомиб, циклофосфамид, преднизолон) и VMP (бортезомиб, мелфалан, преднизолон).

**Таблица 8** – клиническая характеристика больных множественной миеломой

Клинические параметры	Исследуемая группа, n=77
Мужчины	43 (56%)
Медиана возраста, лет	57 (34-77)
Стадия, 3 и 4	51 (66%)
Лактатдегидрогеназа, Е/л	612 (284-22000)
Лейкоциты ( $\times 10^9/\text{л}$ )	5,6 (0,44-21,7)
Гемоглобин (г/л)	11,35 (1,6-123)
Кальций (ммоль/л)	2,31 (1,73-3,55)
Альбумин (г/л)	41,7 (21-99)
Креатинин (мкмоль/л)	81 (43-536)
$\beta 2$ -микроглобулин (мг/л)	3,2 (1,37-20,27)

## 2.2. Лабораторный материал

### 2.2.1. Ведение клеточных линий

В работе использовались линии клеток mel Hn, mel Ibr, mel II, mel Kor, mel Mtp, mel P, mel Si, A875, SK-BR-3, A549 и HCT-116, предоставленных ФГБУ «НМИЦ Онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Линии клеток WI-38 и

WI-38-PRAME любезно представлены Юлией Павловной Финашутинной и Натальей Александровной Лыжко.

Клеточные линии культивировались в среде RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Для некоторых экспериментов использовалась среда с меньшим содержанием сыворотки вплоть до её полного отсутствия.

Сопоставление скорости роста клеток линий WI-38-vector и WI-38-PRAME проводилось в культуральной среде, содержащей разное количество сыворотки – 10%, 5%, 2,5%, 1,25%, 0,625%, 0,313%, 0,156%, 0,078% и 0,039%, а также в среде, не содержащей сыворотки. Перед помещением в данные среды клетки были предварительно дважды отмыты в среде, не содержащей сыворотку.

Инкубирование клеток линий WI-38-vector и WI-38-PRAME в полутвёрдой среде проводилось в течение 10 суток. После этого оценивалось количество сформированных колоний.

### 2.2.2. Исследованные химиопрепараты

В работе использовались химиопрепараты цисплатин (РОНЦ им. Н.Н. Блохина, Россия), цитарабин, доксорубин, винкристин, мелфалан, циклофосфамид, бортезомиб и араноза (РОНЦ им. Н.Н. Блохина, Россия).

Для вычисления концентраций препаратов использовалась методика МТТ-теста. Концентрация, достаточная для гибели 50% клеток, рассчитывалась на основании данных, полученных при проведении МТТ по стандартной методике [190].

Для анализа комбинированного воздействия химиопрепаратов на выживаемость клеток использовалась упрощённая формула (1) расчёта комбинаторного индекса (CI) для IC50, выведенная из теоремы Chou-Talalay [191, 192]:

$$CI = (D)_1 / (Dx)_1 + (D)_2 / (Dx)_2 + \alpha (D)_1 (D)_2 / (Dx)_1 (Dx)_2 \dots \quad (1)$$

Где  $(Dx)_1$  – IC50 вещества 1;  $(D)_1$  – IC50 вещества 1 в комбинации с  $(D)_2$ ;  $(Dx)_2$  – IC50 вещества 2;  $(D)_2$  – IC50 вещества 2 в комбинации с  $(D)_1$ ;  $\alpha=0$  для

веществ со взаимоисключающим эффектом и  $\alpha=1$  для веществ с дополняющим эффектом.

Для интерпретации результата ориентировались на эмпирически подобранные значения CI, изложенные таблице 9 [191, 192].

**Таблица 9** – Интервалы значений CI и соответствие их типам взаимодействия двух веществ

Полученное значение CI	Тип воздействия на клетку
>1,3	Антагонизм
От 1,1 до 1,3	Умеренный антагонизм
От 0,9 до 1,1	Аддитивный эффект
От 0,8 до 0,9	Незначительный синергизм
От 0,6 до 0,8	Умеренный синергизм
От 0,4 до 0,6	Синергизм
От 0,2 до 0,4	Значительный синергизм

#### 2.2.4. Выделение РНК

Выделение тотальной РНК с последующим синтезом кДНК производили при помощи набора реагентов «РНК-экстракт» (ГеноТехнология, Россия) согласно рекомендациям разработчика.

Концентрацию РНК определяли на приборе Qubit (ThermoFisher, США), для чего делали 67-кратные разведения исходной РНК в дистиллированной воде. Для синтеза кДНК брали 2 мкг РНК.

#### 2.2.5. Синтез кДНК

Для проведения реакции обратной транскрипции к раствору целевой РНК (в количестве 2  $\mu\text{g}$ ) добавляли 4  $\mu\text{l}$  раствора случайных гексамеров (концентрация рабочего раствора составляет 90  $\mu\text{M}$ ), разводили полученную смесь до 12  $\mu\text{l}$ , и проводили отжиг в течение 45 с при температуре +94°C. Обратную транскрипцию проводили в фирменном буферном растворе (ThermoFisher, США), содержащем 200 ед. термостабильной ревертазы (ThermoFisher, США), в присутствии 5 ед. ингибитора РНКаз (Синтол, Россия). Реакционная смесь была доведена

деионизированной водой до финального объема 40  $\mu$ l, после чего инкубировалась в течение 65 мин при +37°C.

### **2.2.6. Определение уровня экспрессии *PRAME* методом ПЦР в реальном времени**

Определение уровней экспрессии гена *PRAME* и гена «домашнего хозяйства» (необходимого для жизнедеятельности каждой клетки, и экспрессирующегося стабильно) *ABL* проводили при помощи наборов «Онкоскрин-9Q» и «Онкоскрин-14Q» (ГеноТехнология, Россия) соответственно, согласно рекомендациям разработчика. Для создания группы негативного контроля экспрессии *PRAME* собраны образцы крови 12 здоровых добровольцев, а также проведен анализ активности данного гена в двух образцах костного мозга у больных с негематологическими заболеваниями, и 8 образцов лимфатических узлов без ИГХ-признаков опухолевого поражения.

Вычисление уровня экспрессии анализируемых генов проводилось при помощи программы LightCycler Application согласно рекомендациям разработчика (Roshe, Швейцария).

### **2.2.7. Получение антител**

Мышей линии Balb/c иммунизировали трехкратно с двухнедельными интервалами очищенным белком *PRAME* в дозе 50 мкг/мышь.

Слияние клеток селезенки мышей с миеломными клетками и последующее субклонирование гибридом проводили согласно стандартным методикам [193].

Отбор гибридомных клонов проводили с помощью твердофазного иммуноферментного анализа согласно стандартным методикам, используя рекомбинантный белок *PRAME* в качестве антигена, и методом вестернблоттинга, используя линию клеток K562 с высоким уровнем экспрессии *PRAME* в качестве контроля.

В дальнейшем МКА получали из асцитной жидкости мышей, имеющих в брюшной полости клетки соответственной гибридомы. Иммуноглобулиновую фракцию получали с помощью аффинной хроматографии на G-сефарозе (GE

Healthcare, Великобритания). Изотип антител определяли с помощью набора для изотипирования иммуноглобулинов мыши (Sigma, США).

### 2.2.8. Оценка противоопухолевого эффекта антител *in vivo*

Эксперименты проводились на мышах линии Balb/c Nu/Nu – самках возраста 7-8 недель, выведенных в НМИЦ Онкологии им Н.Н. Блохина Минздрава России. Вес к началу исследования: 18-20 г. Идентификация групп проводилась при помощи ушных меток. Правила, кормления, содержания и ухода, и процедуры по рутинному уходу за животными выполнялись в соответствии с СОП НМИЦ Онкологии им Н.Н. Блохина Минздрава России.

Эксперименты проводили с использованием линии меланомы человека mel P и линии мышинной меланомы B16F10, в которую был трансфицирован вектор для экспрессии гена *PRAME* человека.

Клетки меланомы мыши B16F10 культивировали в среде RPMI при 5% CO<sub>2</sub>. Трансфекцию проводили при 70-80% монослоя клеток в 24-луночном культуральном планшете, используя реагент TransFast (Promega) по инструкции производителя. При этом к  $50 \cdot 10^3$  клеток меланомы мыши B16F10 добавляли 500 нг очищенной от эндотоксинов плазмидной ДНК экспрессионного вектора pCER4-PRAME. Через 48 часов среду заменяли на RPMI с 50 мкг/мл гигромицина. Затем методом лимитирующих разведений на селективной среде при концентрации гигромицина 100 мкг/мл отбирались клетки с максимальной и стабильной экспрессией гена *PRAME*.

Для создания ксенотрансплантата выделяли эффекторные клетки человека. Для выделения клеток из периферической крови здорового добровольца применяли метод осаждения эритроцитов в растворе фикола Diacoll-1077 плотностью 1,077 г/мл. Все эксперименты проводили с использованием клеток от одного донора. Кровь забирали в стерильные пакеты с антикоагулянтом, наслаивали на фиколл и центрифугировали 20 минут при 1200g с отключением торможения. Суспензию мононуклеаров отмывали 2 раза в фосфатно-солевом буфере, после последнего центрифугирования ресуспендировали в физиологическом растворе из

расчета 33млн/мл. Мышам вводили подкожно по 10 миллионов на введение в смеси с клетками меланомы.

Для получения прикрепленной линии mel P клетки культивировали по следующей методике: Ампулу с замороженными клетками оттаивали на водяной бане при 37°C, затем содержимое переносили в среду DMEM и центрифугировали 10 минут при 1200 об/мин. Осадок ресуспендировали в полной ростовой среде, следующего состава: Среда DMEM/High Glucose, HyClone (Кат.№ SH30003.04); Сыворотка плода коровы 5%; L-глутамин 4 мМ; Гентамицин 0,08 мг/мл; Пируват натрия 0,11 мг/мл.

Клетки высевали в культуральные флаконы площадью 75 см<sup>2</sup> в концентрации 10<sup>5</sup> клеток/мл). Культивировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. При таком способе культивирования время удвоения клеток составляло 40-48 часов.

Клетки культивировали до образования 80-90% клеточного монослоя и пересеивали в новые флаконы. Последовательность операций: раствором PBS-ЭТ (PBS с добавлением 1 мМ ЭДТА и 0,025% трипсина) дважды промывали флакон с клетками, чтобы избавиться от остатков культуральной среды, к монослою добавляли PBS-ЭТ и клетки инкубировали в течение 3-5 минут при комнатной температуре при помешивании. Затем суспензию клеток переносили в центрифужную пробирку и центрифугировали 10 минут при 1200 об/мин. Супернатант ресуспендировали в полной ростовой среде, клетки подсчитывали и высевали в новые культуральные флаконы. Для введения мышам клеточный осадок ресуспендировали в среде 199.

Параллельно клетки культивировали в безбелковой бессывороточной ростовой среде SFM4MAb (HyClone, кат.SH30535.04). При культивировании в этой среде клетки теряли способность прикрепляться к пластиковому флакону и приобретали черты суспензионной линии.

Для первого пассажа использовались как прикрепляющийся, так и суспензионный варианты линии mel P. Суспензию mel P центрифугировали, клеточный осадок ресуспендировали в среде 199.

Объем клеточной суспензии составлял 0,5 мл на мышь.

Измерение объемов опухолей в трех взаимоперпендикулярных осях 2 раза в неделю. Объемы определяли по следующей формуле:

$$V = (a * b * c) * \pi / 6 \quad (2)$$

Индекс торможения роста опухоли (ТРО) определяли по следующей формуле:

$$\text{ТРО (\%)} = (V_K - V_P) / V_K * 100 \quad (3)$$

где  $V_K$  и  $V_P$  – средний объем опухоли в контрольной группе и группе препарата соответственно.

### 2.3. Методы статистического анализа

Для оценки различий между группами по качественным признакам использовали критерий  $\chi^2$ . Для оценки связи между количественными переменными применяли корреляционный анализ Пирсона. Для сопоставления количественных признаков в двух группах больных использовали критерий Манна-Уитни. В случае, если в сравнении было больше двух групп, применяли медианный тест. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

При анализе параметров выживаемости больных онкогематологическими заболеваниями осуществляли подбор такого порогового уровня экспрессии *PRAME*, при котором достигались наиболее значимые различия между группами больных с большим и меньшим уровнем экспрессии данного гена. При ОВ событием считали смерть больного, БСВ – смерть больного, рецидив или прогрессирование заболевания. Параметры выживаемости рассчитывали от момента проведения исследования уровня экспрессии *PRAME*. Для оценки связи между уровнем экспрессии *PRAME* и активностью Ki-67 строили линейную регрессионную модель. Не все образцы больных были доступны для исследования, вследствие чего для некоторых случаев данные были неполными. Так как выборки небольшие, выявленные различия считались статистически значимыми при  $p < 0,1$ .

Для сравнения чувствительности клеточных линий к бортезомибу применяли критерий Уилкоксона для парных наблюдений.



При кластерном анализе данных больных фолликулярной лимфомой данные были преобразованы. Непрерывные значения абсолютного уровня экспрессии гена *PRAME* в лимфатическом узле были трансформированы в ранговые. Ранг «0» соответствовал отсутствию экспрессии *PRAME*, ранг «1» – уровню экспрессии больше 0 и меньше 5%, и ранг «2», который соответствовал уровню экспрессии *PRAME*, превышающему 5%. Баллы, вычисленные при определении групп риска по FLIPI, были заменены рангами, где ранг «0» соответствовал низкому риску по FLIPI-1 и FLIPI-2, «1» – промежуточному риску, и «2» – высокому риску. Объединение объектов в кластеры производили методом Варда. В качестве меры расстояния использовали процент несогласия между категориальными данными. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

Данные комбинаторного индекса бортезомиба и других химиопрепаратов были преобразованы путём вычисления натурального логарифма из исходных значений. Для вычисления размеров кластеров следовали правилам вычисления взвешенного попарного среднего между кластерами. При определении расстояния между кластерами вычисляли Евклидово расстояние.

При анализе профиля экспрессии, полученных при помощи микрочипов, использовали критерий Манна-Уитни. Поскольку число рассматриваемых генов было очень большим, различия в их экспрессии между контрольной и опытной линией рассчитывали с поправкой Бонферрони, согласно которой различия в экспрессии каждого из 25000 анализируемых генов считались статистически значимыми при  $p < 0,2 * 10^{-5}$ .

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

### 3.1. Биоинформатический анализ происхождения, регуляции и драйверных свойств PRAME

#### 3.1.1. Анализ происхождения генов семейства PRAME

Проводился биоинформатический анализ данных последовательностей генома человека и других организмов, доступных в базе данных Genome Browser. Проводилось выравнивание последовательностей генов, картированных у разных представителей млекопитающих. Оценивалось расположение генов группы PRAME относительно более древних генов. Целью было нахождение генов, гомологичных PRAME, установление этапов происхождения отдельных представителей этого семейства.

Установлено, что группа генов PRAME человека объединяет следующих представителей – *LRRC14*, *LRRC14b*, собственно PRAME, PRAME-NP, PRAME-X, PRAME-F и открытый нами PRAME-PRIM. Сопоставление геномных последовательностей показало, что все гены семейства произошли от гена *LRRC14* путём его транспозирования в другие локусы, эволюционной изменчивости, и, в некоторых случаях, дубликации. Для отслеживания этапов эволюции генов, представленных в данной группе, были определены положения и структура других генов, расположенных в этих же локусах. Ввиду того, что семейство генов PRAME достаточно молодо, другие гены, находящиеся в непосредственной близости от них, эволюционно старше. Благодаря этому, они использовались в качестве маркеров, которые позволили провести более точную систематизацию генов семейства PRAME у млекопитающих и человека.

*LRRC14* и *LRRC14b*. *LRRC14* – это очень древний ген, который может быть обнаружен у всех позвоночных животных, в том числе у человека, лягушки (*Xenopus tropicalis*), сизого голубя (*Columba livia*), лучеперой рыбы Нотобранх Фурцера (*Nothobranchius furzeri*), гребнистого крокодила (*Crocodylus porosus*) и тигровой змеи (*Notechis scutatus*). У плацентарных млекопитающих 5'-конец гена *LRRC14* пересекается с последовательностью гена *LRRC24*, который

транскрибируется в обратном направлении. У сумчатых млекопитающих ген *LRRC14* представлен в виде трёх копий, ни одна из которых не имеет пересечения с *LRRC24*. Поскольку гены *LRRC14* и *LRRC14b* могут быть обнаружены в геноме всех млекопитающих, мы предполагаем, что более 165 миллионов лет назад у общего предка млекопитающих произошло транспозирование *LRRC14*, которое привело к формированию гена *LRRC14b*. Активность *LRRC14b* регулируется транскрипционными факторами CTCF и BORIS (CTCF-L). Главная особенность, отличающая *LRRC14* и *LRRC14b* от остальных генов семейства *PRAME* – их экспрессия как в соматических, так и половых клетках. По этой причине белки *LRRC14* и *LRRC14b* не являются раково-тестикулярными.

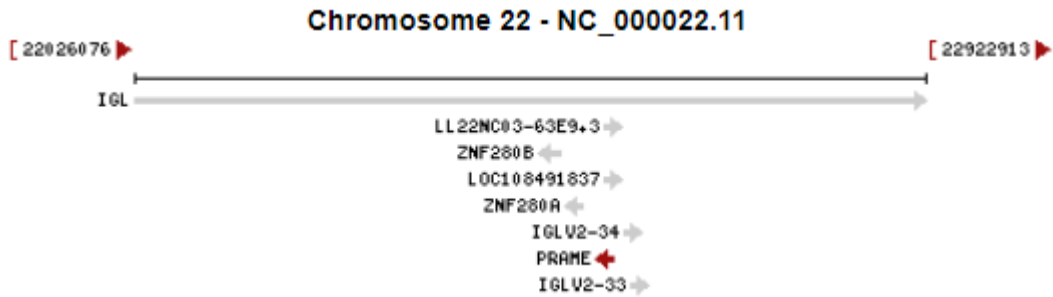
С наибольшей вероятностью гены семейства *PRAME* произошли путём дупликации гена *LRRC14*. Все эволюционно более молодые гены, чем *LRRC14* представители семейства *PRAME*, унаследовали сайты для связывания CTCF.

*PRAME*, открытый Hideyuki Ikeda. Ген *PRAME* был открыт группой Ikeda et al. в 1997 году [32]. *PRAME* человека и плацентарных млекопитающих расположен на хромосоме 22, в локусе, кодирующем фрагменты гена иммуноглобулина  $\lambda$ . Перед 3'-концом *PRAME* расположен ген *LOC108491837*, гены, кодирующие РНК 63 и miP-650, а также сайт, распознающийся транспозазой. Далее по хромосоме, за 5'-концом *PRAME* всегда расположены гены *ZNF280a* и *ZNF280b*, благодаря чему можно картировать *PRAME* в геноме других организмов (Рисунок 5). У сумчатых млекопитающих в локусе гена  $\lambda$ -цепи присутствует ген, кодирующий miP-650, в то время как последовательность гена *PRAME* в данном локусе не обнаружена.

Функции гена *LOC108491837*, экспрессирующегося в половых клетках человека, неизвестны [194].

РНК 63 может кодировать небольшой белок. Со второго экзона гена этой РНК транскрибируется miP-650. miP-650 эволюционно древняя, так как обнаружена у ланцетника и у червей. miP-650 блокирует экспрессию некоторых генов, в том числе *CDK1*, *ING4* и *EBF3*. Длина незрелой miP-650 – 92 нуклеотида. Интересно, что в гене miP-650 расположен интрон длиной в 25 нуклеотидов.

Благодаря сплайсингу, миР-650 может образовывать до 5 форм, имеющих длины 20-24 нуклеотида. Отличается экспрессией на не высоком уровне [195].



**Рисунок 5** – схема локуса гена *PRAME* человека

Гены *ZNF280a* и *ZNF280b* кодируют транскрипционные факторы с неизвестными к настоящему моменту функциями. Ген *ZNF280a* обладает сопоставимым паттерном экспрессии с геном *PRAME* [196]. Возможно, мощный промотор гена *PRAME* контролирует экспрессию *ZNF280a*. Ген *ZNF280b* расположен дальше от *PRAME*, и, возможно, не подчиняется промотору гена *PRAME* [197]. Вследствие этого экспрессия мРНК *ZNF280b* и *PRAME* коррелирует в меньшей степени по сравнению с *ZNF280a* и *PRAME*.

Появление генов *ZNF280a*, *ZNF280b* и *PRAME* в локусе *Igλ* произошло одновременно у общего предшественника плацентарных млекопитающих. Впервые *PRAME* в этом локусе мог появиться у сумчатых барсуков – бандикутов (отряд *Peramelemorphia*), для которых характерна наиболее развитая плацента среди сумчатых [198, 199].

В результате сплайсинга 5'-конца формируется множество вариантов матричных РНК гена *PRAME*. Эти изоформы позволяют синтезировать два белка – длиной 509 и 493 а.о. Длинная (509 а.о.) форма белка *PRAME* имеет неизвестные функции. Выполненное нами 3d-моделирование показало, что стехиометрия не позволяет ей участвовать в убиквитинировании, так как белок такого размера просто не помещается в комплекс *CUL2*. С другой стороны, изоформа *PRAME* длиной 493 а.о. образует комплекс свободно, вследствие чего именно она отвечает за убиквитинирование субстратов при посредничестве системы *CUL2*.

У большинства плацентарных млекопитающих локус, содержащий ген *PRAME* и *ZNF280b*, подвергся дупликации в других хромосомах. У парнокопытных

обнаружено множество копий гена *PRAME* в хромосомах 16 и Y. У человека дупликация *PRAME* произошла в хромосоме 1 [200].

Для некоторых нормальных тканей человека характерна экспрессия гена *PRAME*. Наиболее высокие уровни экспрессии наблюдаются в мужских половых клетках, более низкие – в клетках яичников (Рисунок 6) [201].

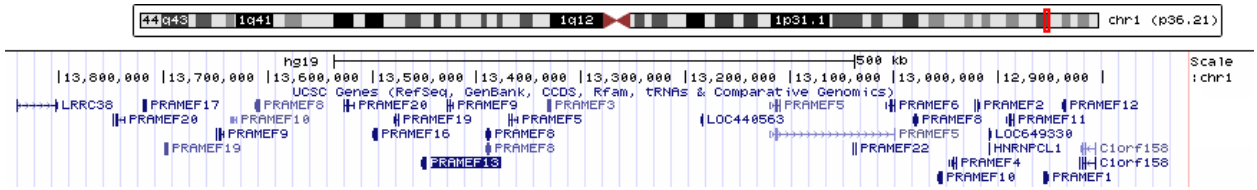


**Рисунок 6** – экспрессия гена *PRAME* в тканях человека (данные pubmed)

Согласно нашим данным, при проведении реакции ПЦР с использованием специфических праймеров и флуоресцентного зонда с чувствительностью  $10^{-7}$  экспрессия гена *PRAME* в клетках крови здорового человека не определяется [122].

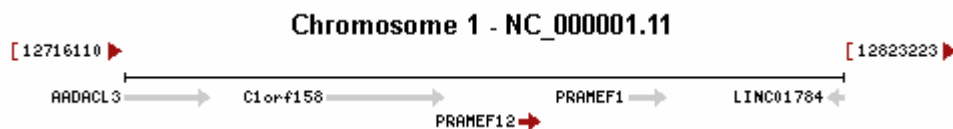
*PRAME-F*. Маркеры, позволяющие определить расположение генов группы *PRAME-F* – *C1ORF158* и *LRRC38*. В локусе, ограниченном данными генами у разных видов млекопитающих, может быть обнаружено разное количество генов *PRAME-F* (Рисунок 7). Максимальное количество генов данной группы найдено у приматов. У других отрядов млекопитающих - значительно меньше. Например, в геноме у большинства представителей отряда хищные присутствует одна копия

гена *PRAME-F*. У египетской летучей собаки (*Rousettus aegyptiacus*) не обнаружено ни одной копии.



**Рисунок 7** – кластер генов группы *PRAME-F* человека, данные ресурса Genome Browser, сборка GRCh37/hg19 от февраля 2009

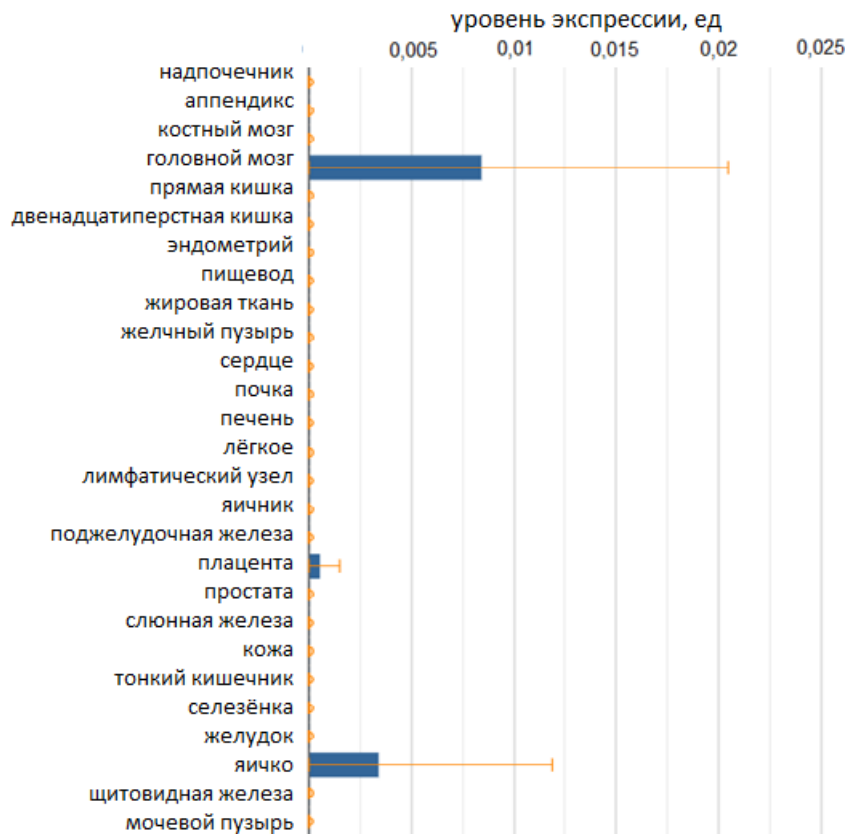
У человека локус длиной 775 мб, содержащий 36 генов *PRAME-F*, расположен на хромосоме 1. Все гены группы *PRAME-F* человека произошли путём дупликации *PRAME-12F* (Рисунок 8). Дупликации привели к тому, что гены *PRAME-F* организованы в 4х кластера, каждый из которых ограничен генами гетероядерных нуклеопротеинов *HNRNPC*. У ящерицы этот участок имеет длину только 10 мб. Перед 5'-концом каждого гена *PRAME-F* расположен ген длинной некодирующей РНК, длиной 460 нуклеотидов. Ген этой РНК ориентирован в прямое положение относительно гена. По краям группы гены не имеют некодирующей РНК. Гены, кодирующие различные миР, не были обнаружены.



**Рисунок 8** – схема локуса гена *PRAME-F12* человека

У человека локус длиной 775 мб, содержащий 36 генов *PRAME-F*, расположен на хромосоме 1. Все гены группы *PRAME-F* человека произошли путём дупликации *PRAME-12F* (Рисунок 8). Дупликации привели к тому, что гены *PRAME-F* организованы в 4х кластера, каждый из которых ограничен генами гетероядерных нуклеопротеинов *HNRNPC*. У ящерицы этот участок имеет длину только 10 мб. Перед 5'-концом каждого гена *PRAME-F* расположен ген длинной некодирующей РНК, длиной 460 нуклеотидов. Ген этой РНК ориентирован в прямое положение относительно гена. По краям группы гены не имеют некодирующей РНК. Гены, кодирующие различные миР, не были обнаружены.

Гены *PRAME-F* кодируют белки длиной 474 а.о. с неизвестными функциями. У человека *PRAME-F* экспрессируются в небольших количествах по сравнению с *PRAME* в тканях мозга, в семенниках и на ранних этапах эмбриогенеза. Уровень экспрессии генов данной группы обычно сопоставим между собой (Рисунок 9) [201].



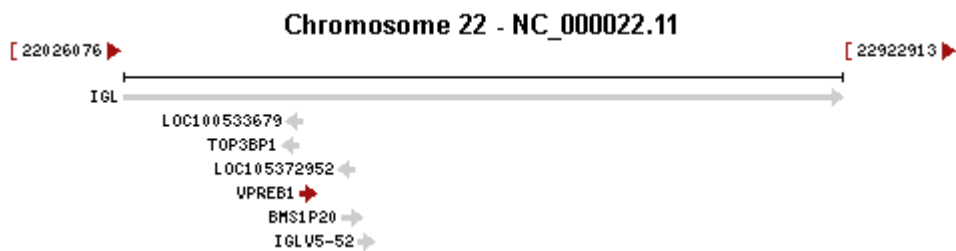
**Рисунок 9** – экспрессия гена *PRAME-F12* в тканях человека, (данные pubmed)

Существует интересная особенность у быков (*Bos taurus taurus*). На их хромосоме Y присутствуют гены *PRAME-Y*, произошедшие, вероятно, путём дупликации *PRAME* [200, 202]. Происхождение подтверждается тем, что в локусе, содержащем гены *PRAME-Y*, обнаружены также последовательности генов, гомологичным человеческим *ZNF280a* и *ZNF280b*.

*PRAME-NP*. Название данного гена призвано показать, что N-конец кодируемого белка представляет собой фрагмент белка PRAME. Маркером, позволяющим определить гены *PRAME-NP*, который расположен часто на той же хромосоме, что *PRAME*, являются гены *VPREB1* и *TOP3b*. В окрестности *PRAME-*

*NP* отсутствуют *ZNFs*. Из первого интрона в «+» цепи экспрессируется слайсируемая длинная некодирующая РНК *LL22NC03-23C6.13*, а также присутствует ген, кодирующий миР-130с-2. Эта РНК древняя, и обнаруживается в геноме многих организмов, в том числе рыб.

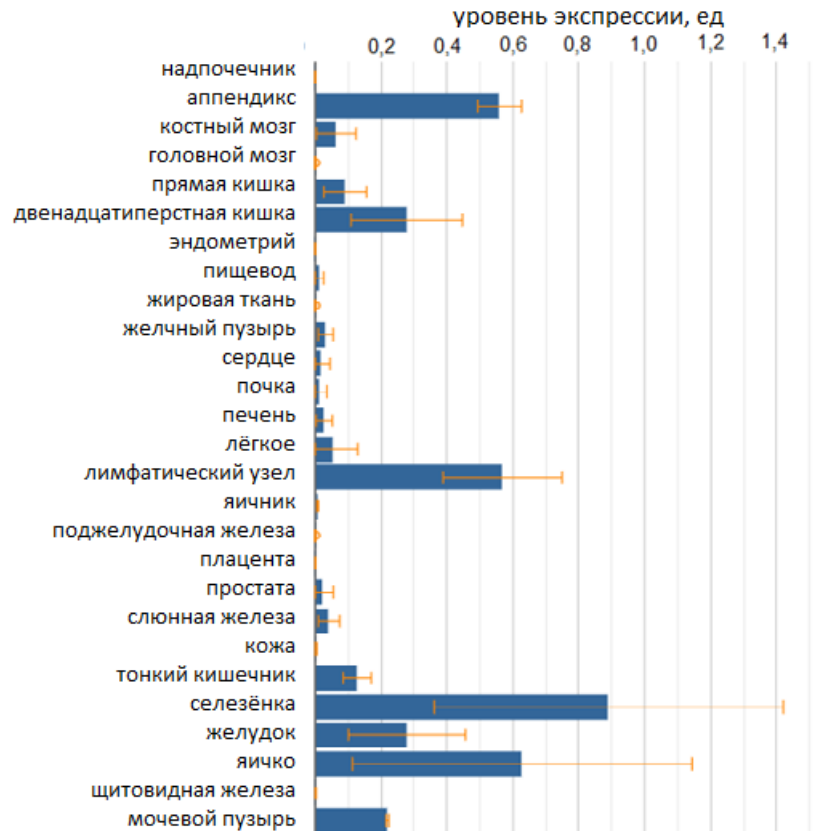
Интересно, что *PRAME-NP* находится на «-» цепи ДНК на краю иммуноглобулинового кластера. В его интроны входят гены иммуноглобулинов, ориентированных в обратном положении. Возможно, *PRAME-NP* моложе *PRAME*, так как отсутствует у сумчатых, но может быть обнаружен у плацентарных в виде гена, содержащего несколько фрагментов *PRAME*. Так, у отдельных представителей летучих мышей присутствует как целый ген, так и фрагменты, но в некоторых случаях может наблюдаться полная делеция гена. У большинства сумчатых млекопитающих в локусе генов *VPREB1* и *TOP3b* отсутствует *PRAME-NP*, однако обнаруживается ген, кодирующий миР-130с-2. Так, в геноме опоссума можно найти *TOP3b*, миР, но не обнаруживаются никаких последовательностей, гомологичных гену *PRAME*. В геноме кенгуру присутствует *TOP3b*, миР, но также нет *PRAME-NP*. Однако у броненосца и пищухи ген *PRAME-NP* представлен в виде отдельных фрагментов. Интересно, что наиболее полные последовательности гена *PRAME-NP* обнаружены у высших приматов. Максимальная длина гена составляет около 60 кб. *PRAME-NP* человека состоит из двух экзонов, экспрессируется, и формирует, по меньшей мере, 3 мРНК (Рисунок 10).



**Рисунок 10** – Схема локуса гена *PRAME-NP* человека

У многих плацентарных ген *PRAME-NP* образует белки с неизвестными функциями. У человека *PRAME-NP* экспрессируется в семенниках, селезёнке (на максимальном уровне), и кишечнике и в некоторых других тканях (Рисунок 11). Уровень экспрессии по сравнению с геном *PRAME* относительно небольшой (0,6 vs 46 RPKM).



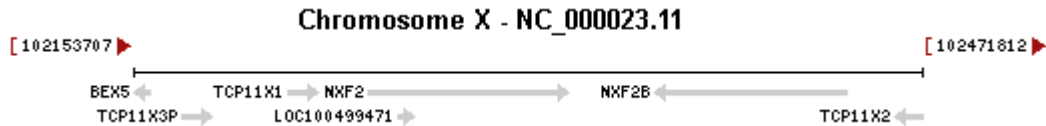


**Рисунок 11** – Экспрессия гена *PRAME-NP* в тканях человека (данные pubmed)

*PRAME-X*. Гены *PRAME-X* расположены на X-хромосоме. Маркеры для нахождения *PRAME-X* – слева ген *BEX5*, справа – *TCP11X2* (Рисунок 12). Иногда – X-хромосомные гены *NFX5* и *NFX3*. Количество копий этих генов небольшое, обычно не более двух, за исключением жвачных, имеющих огромное количество копий генов этой группы на соматических хромосомах. Например, у коровы (*Bos taurus taurus*) они находятся на хромосоме 17.

Некодирующая РНК и миР пока не обнаружены. В геноме носорога с последовательностью гена *PRAME-X* рядом есть длинные некодирующие РНК, гомологи человеческих РНК.

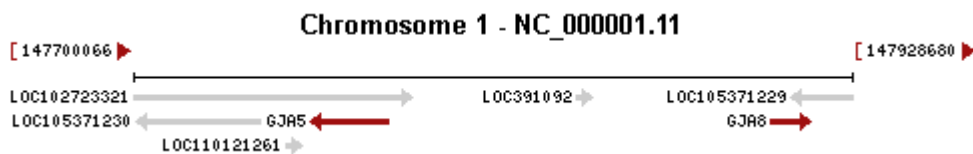
У низших приматов и других млекопитающих эти гены экспрессируются с образованием белка. У человека обнаружено два не экспрессирующихся псевдогена *PRAME-X*, возникших в результате дупликации всего локуса. У низших приматов *PRAME-X* также активен и экспрессируется. Функция кодируемых белков неизвестна.



**Рисунок 12** – схема локуса, содержащего гены *PRAME-X* человека

*PRAME-PRIM*. Наши исследования позволили установить наличие ещё одной группы генов, гомологичных *PRAME*. Так как эти гены присутствуют только у высших обезьян, мы дали им название *PRAME-PRIM*. Данные гены не обнаружены у мартышек и лемуров. Возможно, *PRAME-PRIM* произошли от одного из генов группы *PRAME-F*. Маркеры *PRAME-PRIM* – гены *GJA8* и *GJA5*, кодирующие белки-коннексины, которые предназначены для формирования щелевых контактов между двумя соседними клетками (Рисунок 13) [203]. В зоне рядом с *PRAME-prim* расположено более 10 генов, кодирующих микроРНК, причем уже зрелых, несплайсируемых.

Гены *PRAME-PRIM* содержат 3 экзона и 2 интрона. Экспрессируются в коре надпочечников. Кодируют мРНК и белок длиной 382 а.о. с неизвестными функциями. Так же, как и все другие гены семейства *PRAME*, регулируется эпигенетически транскрипционными факторами CTCF и CTCFL. *PRAME-PRIM* человека расположен на хромосоме 1. Точные координаты – 147.840.952-147.842.497.



**Рисунок 13** – схема локуса, содержащего гены *PRAME-PRIM* человека

Другие фрагменты генов *PRAME*. В хромосоме 5 человека нами обнаружены последовательности, гомологичные последовательностям гена *PRAME* (экзон 2 и часть интрона). У хищных млекопитающих (собака, домашняя кошка) в геноме обнаружены либо целый ген *PRAME*, либо фрагменты, расположенные между *C1ORF158* и *LRRC38*.

### 3.1.2. Изменения профиля экспрессии генов и сигнальных путей после трансфекции клеток WI-38 геном *PRAME*

По сравнению с контрольной линией WI-38, трансфицированной вектором, не имеющим вставки гена, скорость пролиферации клеток WI-38-*PRAME* увеличилась вдвое ( $p=0,0304$ ).

Согласно данным микрочипов, активность *PRAME* оказала влияние на множество генов. При этом наибольшим изменениям подверглась экспрессия генов *RAB2*, *SP110*, *GIP3*, *MAGEA12*, *MAGEA6*, *MAGEA3*, *EST*, *STAT1*, *ACTINB*, *EMP2*, *MAD2* и некоторых других, которые не приведены, так как их функции по-прежнему не установлены, либо малозначимы в процессах опухолевого перерождения и прогрессии. Приводим также информацию о генах, активность которых, согласно данным литературы, меняется в случае изменения уровня экспрессии гена *PRAME* (Таблица 10).

В промоторах генов, экспрессия которых статистически значимо изменилась, были обнаружены сайты связывания транскрипционного фактора NFY. Исключения составляют гены *SP110*, *MAGEA12*, *MAGEA6* и *MAGEA3*, в промоторах которых сайтов связывания для фактора NFY обнаружено не было.

В промоторах генов *RAB2*, *EST*, *GIP3*, *STAT1*, *ACTB*, *EMP2* и *MAD2L1* обнаружены места посадки транскрипционного фактора NFY. В промоторах генов *SP110*, *GIP3*, *MAGE A12*, *MAGE A6*, *MAGE A3*, *STAT3*, *TP53*, *NCOR1*, *VEGFA*, *VEGFB*, *VEGFC*, *SOX9* и *TRAIL* такие места не были обнаружены.

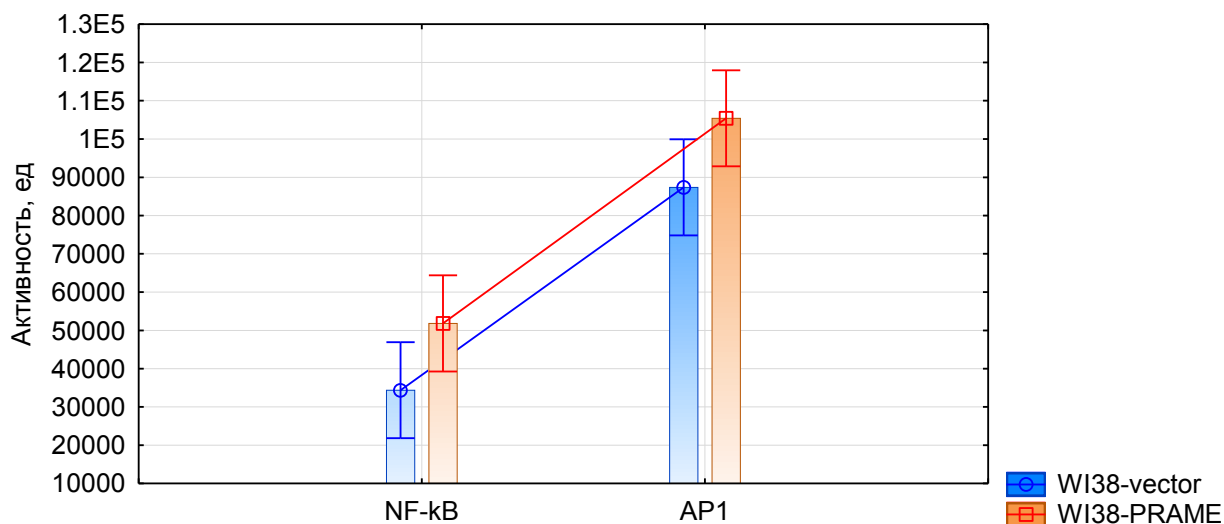
Трансфекция генами-репортёрами активности транскрипционных факторов NF- $\kappa$ B и AP1 показала, что в клетках линии WI-38-*PRAME* данные сигнальные пути более активны по сравнению с родительской линией ( $p<0,05$  для обоих факторов) (Рисунок 14).

**Таблица 10** – Влияние трансфекции гена *PRAME* на активность других генов в линии WI-38

Ген	Наличие сайта связывания для фактора NFY	Функции кодируемого белка	Изменение уровня экспрессии после трансфекции гена <i>PRAME</i> , кратность относительно контроля	P (граничное значение, принятое с учётом поправки Бонферрони, составляет $6,2 \cdot 10^{-6}$ )
<i>RAB2A</i>	+	Передача сигнала по RAS-зависимому пути	2,26	$2,3 \cdot 10^{-8}$
<i>SP110</i>	-	Активатор транскрипции	2,27	$2,1 \cdot 10^{-8}$
<i>GIP3</i>	+	Блокирование апоптоза	2,69	$1,1 \cdot 10^{-9}$
<i>MAGE A12</i>	-	Антиген меланомы	4,36	$4,6 \cdot 10^{-9}$
<i>MAGE A6</i>	-	Антиген меланомы	4,14	$6,2 \cdot 10^{-9}$
<i>MAGE A3</i>	-	Антиген меланомы	4,86	$1,4 \cdot 10^{-10}$
<i>STAT1</i>	+	Передача сигнала по STAT-зависимому пути	3,65	$9,5 \cdot 10^{-8}$
<i>ACTB</i>	+	Актин, компонент цитоскелета	2,07	$5,8 \cdot 10^{-8}$
<i>EMP2</i>	+	Активатор апоптоза	0,49	$2,5 \cdot 10^{-8}$
<i>MAD2L1</i>	+	Активатор апоптоза	0,48	$4,6 \cdot 10^{-8}$

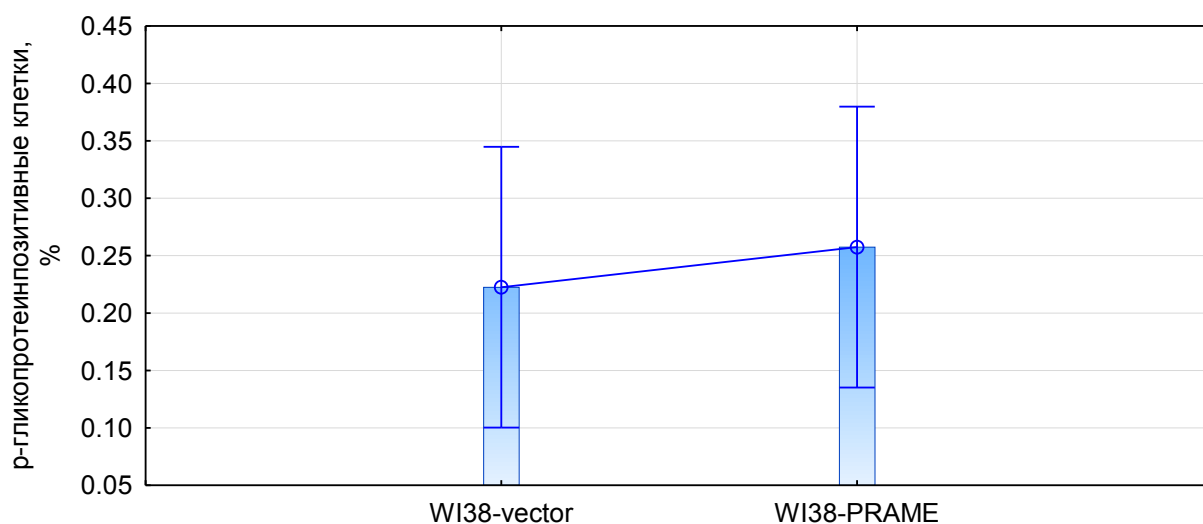
Ген	Наличие сайта связывания для фактора NFY	Функции кодируемого белка	Изменение уровня экспрессии после трансфекции гена <i>PRAME</i> , кратность относительно контроля	P (граничное значение, принятое с учётом поправки Бонферрони, составляет $6,2 \cdot 10^{-6}$ )
<i>S100A4</i>	-	Повышение мобильности	0,81	$9,7 \cdot 10^{-5}$
<i>P21</i>	-	Супрессор перехода в фазу G1 клеточного цикла	1,13	$3,0 \cdot 10^{-5}$
<i>P27</i>	+	Супрессор перехода в фазу G1 клеточного цикла	0,7	$3,1 \cdot 10^{-5}$
<i>STAT3</i>	-	Передача сигнала по STAT-зависимому пути	0,95	$6,2 \cdot 10^{-4}$
<i>TP53</i>	-	Противоопухолевый фактор	1,18	$1,7 \cdot 10^{-4}$
<i>NCOR1</i>	-	Репрессор транскрипции	0,93	$6,4 \cdot 10^{-4}$
<i>VEGFA</i>	-	Сосудистый фактор роста А	0,87	$1,0 \cdot 10^{-4}$
<i>VEGFB</i>	-	Сосудистый фактор роста В	0,94	$5,1 \cdot 10^{-5}$
<i>VEGFC</i>	-	Сосудистый фактор роста С	1,01	$2,2 \cdot 10^{-4}$

Ген	Наличие сайта связывания для фактора NFY	Функции кодируемого белка	Изменение уровня экспрессии после трансфекции гена <i>PRAME</i> , кратность относительно контроля	P (граничное значение, принятое с учётом поправки Бонферрони, составляет $6,2 \cdot 10^{-6}$ )
<i>SOX9</i>	-	Активатор клеточной дифференцировки	1,18	$3,7 \cdot 10^{-5}$
<i>TRAIL</i>	-	Фактор апоптоза	0,98	$3,1 \cdot 10^{-4}$
<i>MDM2</i>	-	Блокатор белка p53	1,13	$6,2 \cdot 10^{-5}$
<i>RAR<math>\alpha</math></i>	+	Активатор клеточной дифференцировки $\alpha$ , зависимый от РК	1,03	$1,23 \cdot 10^{-5}$
<i>RAR<math>\beta</math></i>	-	Активатор клеточной дифференцировки $\beta$ , зависимый от РК	0,79	$3,1 \cdot 10^{-4}$
<i>CEBPA</i>	-	Активатор транскрипции	1,09	$6,1 \cdot 10^{-4}$
<i>CEBPE</i>	-	Активатор транскрипции	1,05	$3,8 \cdot 10^{-4}$
<i>YY1</i>	+	Активатор транскрипции	0,89	$7,2 \cdot 10^{-4}$
<i>EZH2</i>	+	Репрессор транскрипции	0,69	$5,6 \cdot 10^{-5}$



**Рисунок 14** – Активность NF-kB и AP1 в клетках WI-38

Согласно данным проточной цитометрии, активность р-гликопротеина после трансфекции гена *PRAME* в клетках WI-38 не изменилась ( $p > 0,2$ , Рисунок 15).

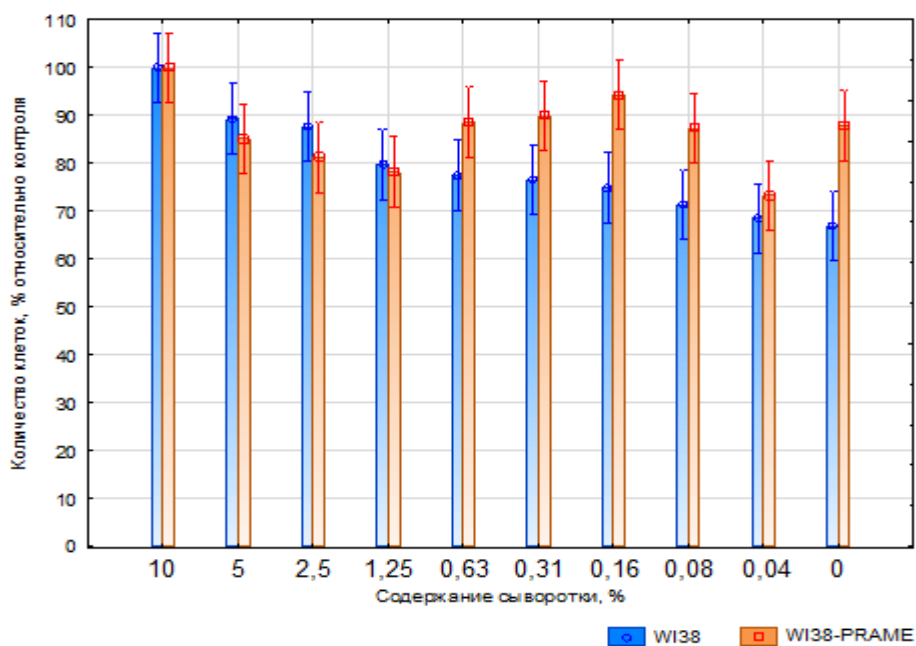


**Рисунок 15** – Активность р-гликопротеина на поверхности клеток WI-38

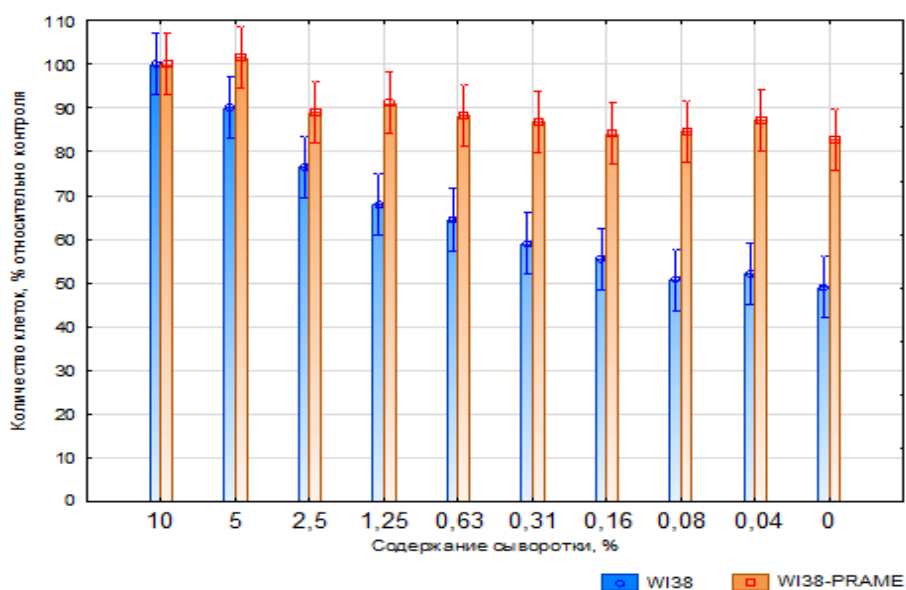
### 3.1.3. Сопоставление скорости роста линий клеток WI-38-vector и WI-38-PRAME в культуральной среде с низким содержанием сыворотки

Согласно данным, полученным методом МТТ, снижение содержания сыворотки прямо коррелировало со снижением скорости роста клеток, наблюдаемым в течение четырёх суток. При этом влияние пониженного количества сыворотки оказывало статистически значимо меньшее влияние на скорость роста линии WI-38-PRAME по сравнению с линией WI-38-vector. Скорость роста клеток линии WI-38 была тем меньшей, чем меньше сыворотки находилось в

культуральной среде ( $p < 0,0001$ , Рисунок 16), особенно на третьей сутки эксперимента ( $p < 0,00001$ , Рисунок 17). Данная зависимость была линейной, что подтверждается качеством построения регрессионной модели (значение скорректированного  $R^2$  составило 0,8646). Напротив, скорость роста клеток WI-38-PRAME зависела нелинейно от количества сыворотки в культуральной среде (значение скорректированного  $R^2$  составило 0,0032 для линейной модели).



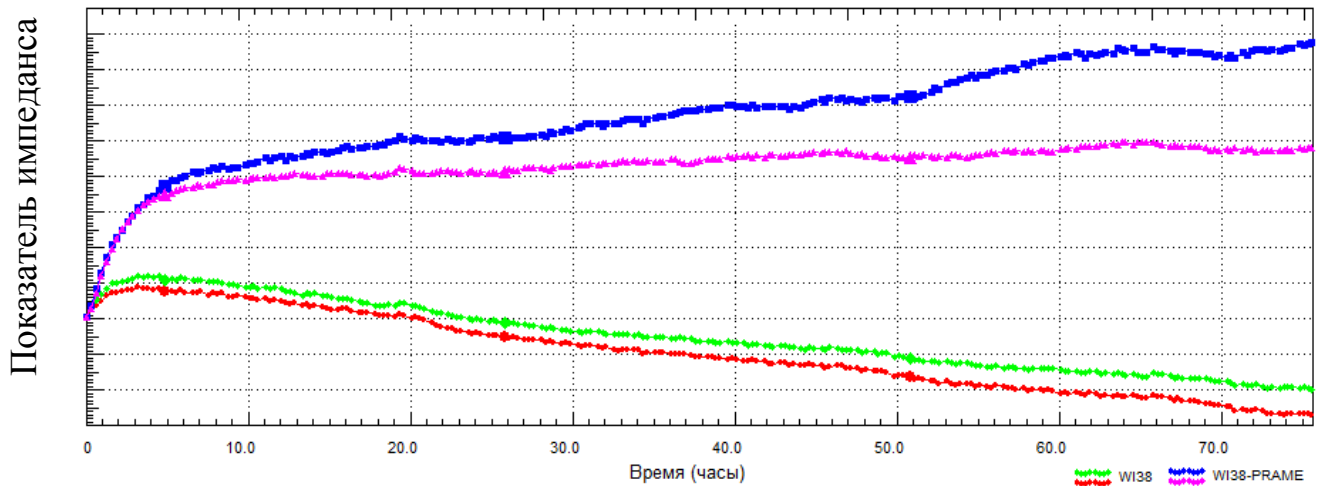
**Рисунок 16** – Рост клеток линий W38-vector и WI-38-PRAME в среде без сыворотки в течение суток (данные МТТ)



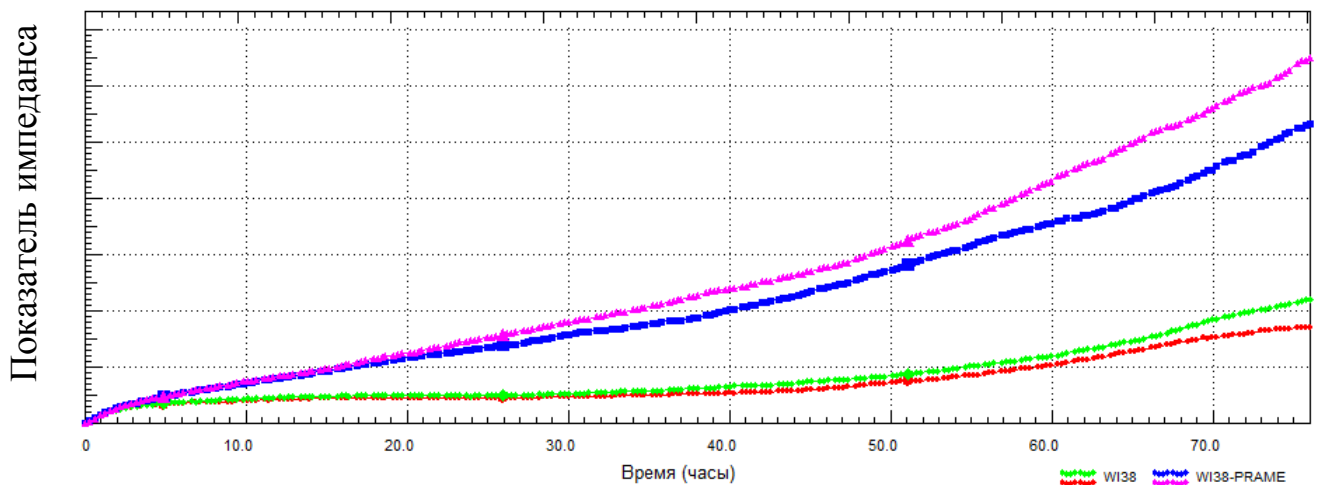
**Рисунок 17** – Рост клеток линий W38-vector и WI-38-PRAME в среде без сыворотки в течение трёх суток (данные МТТ)



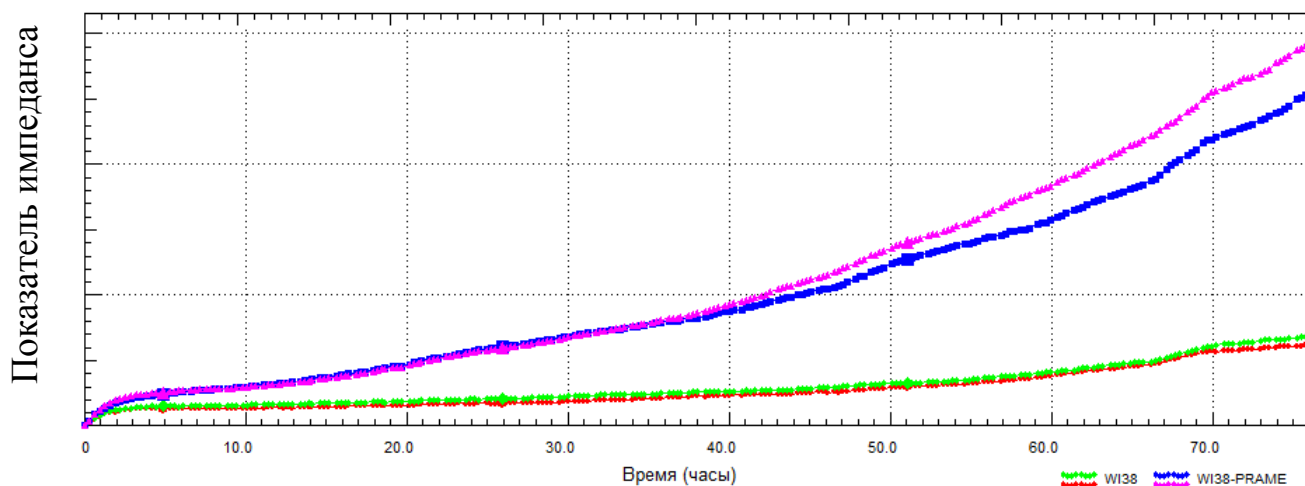
В независимом эксперименте проводили сравнение скорости роста клеток линий WI-38-vector и WI-38-PRAME в реальном времени, для чего использовали система xCELLigence (ACEA Biosciences, США). Мы наблюдали значительную разницу в скорости роста данных линий в средах, содержащих 5%, 10% и 15% сыворотки. Во всех случаях клетки линии WI-38-PRAME росли быстрее, чем клетки WI-38-vector ( $p < 0,00001$ , Рисунки 18-20).



**Рисунок 18** – Рост клеток линий W38-vector и WI-38-PRAME в среде, содержащей 5% сыворотки в течение трёх суток (данные xCELLigence)



**Рисунок 19** – Рост клеток линий W38-vector и WI-38-PRAME в среде, содержащей 10% сыворотки в течение трёх суток (данные xCELLigence)

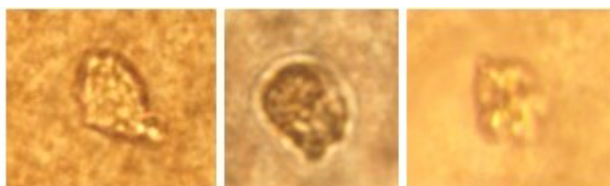


**Рисунок 20** – Рост клеток линий WI-38-vector и WI-38-PRAME в среде, содержащей 15% сыворотки в течение трёх суток (данные xCELLigence)

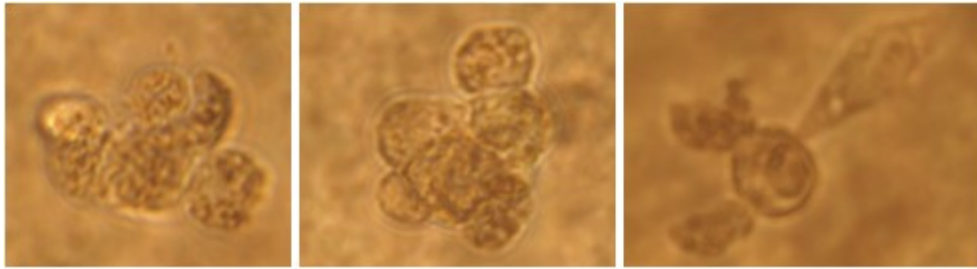
Полученные результаты свидетельствуют как о PRAME-опосредованном увеличении скорости пролиферации клеток, так и придании клеткам способности к пролиферации в условиях дефицита ростовых факторов в среде.

#### 3.1.4. Способность клеток линий WI-38-vector и WI-38-PRAME формировать колонии в полутвёрдой среде

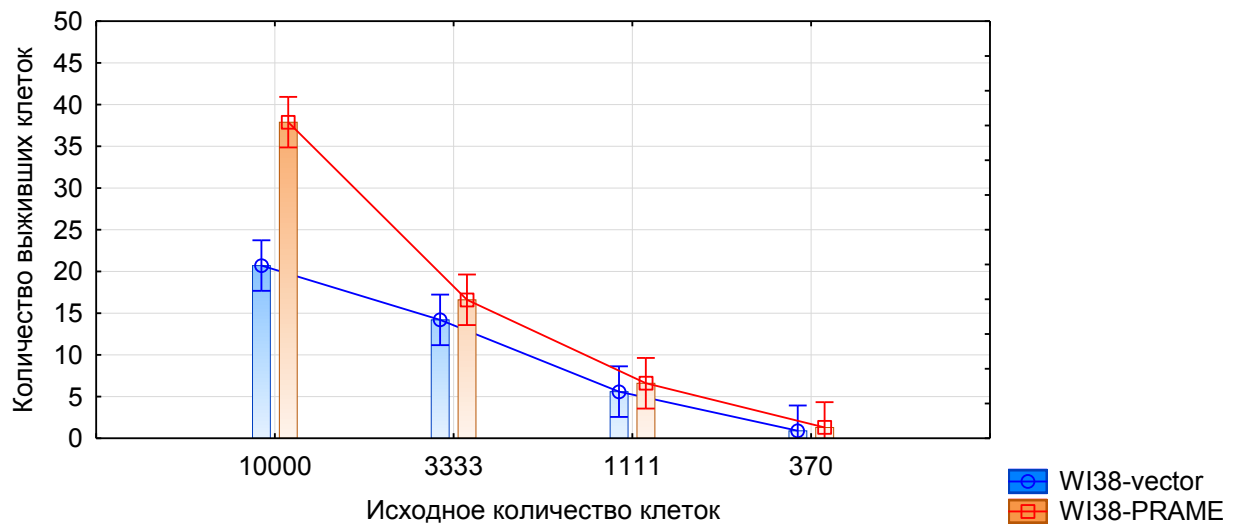
Установлено, что на поверхности полутвёрдой среды выживали единичные клетки линии WI-38-vector. Клетки линии WI-38-PRAME выживали в статистически значимо большем числе по сравнению с клетками WI-38, и формировали колонии (Рисунки 21-24). В отличие от родительской линии клетки WI-38 с экспрессией *PRAME* были способны формировать колонии в полутвёрдой среде.



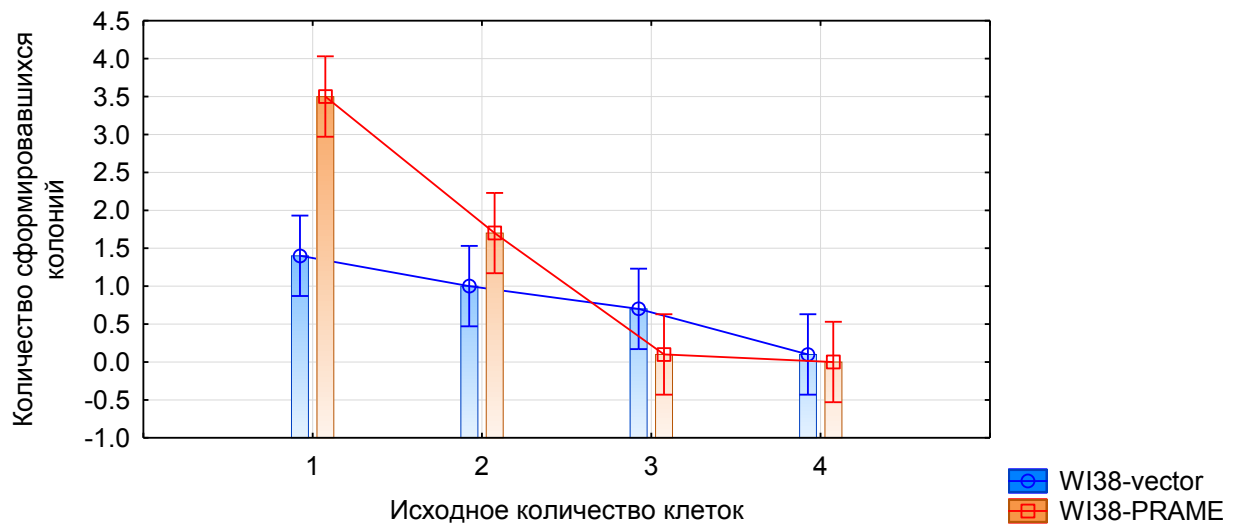
**Рисунок 21** – единичные клетки WI-38-vector в агарозе



**Рисунок 22** – колонии клеток WI-38-PRAME в агарозе



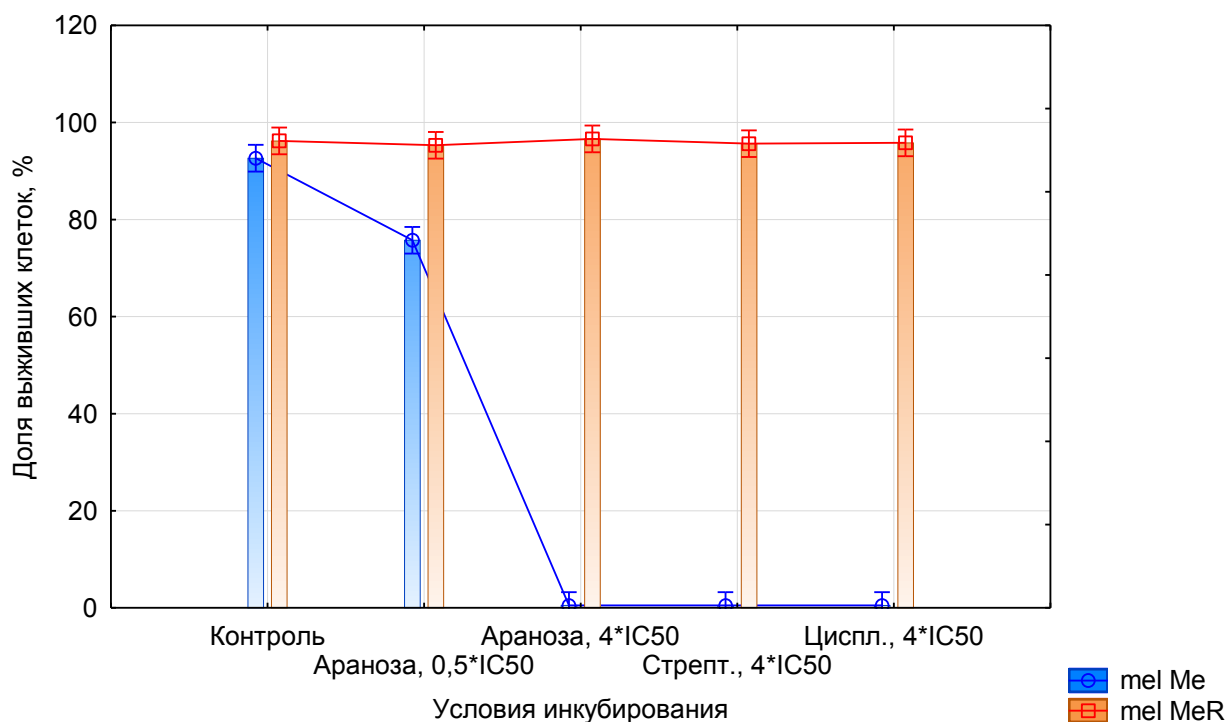
**Рисунок 23** – Сопоставление числа клеток линий WI-38-vector и WI-38-PRAME, выросших в полутвёрдой среде



**Рисунок 24** – Сопоставление числа колоний линий WI-38-vector и WI-38-PRAME, выросших в полутвёрдой среде

### 3.1.5. Участие *PRAME* в процессах развития химиорезистентности

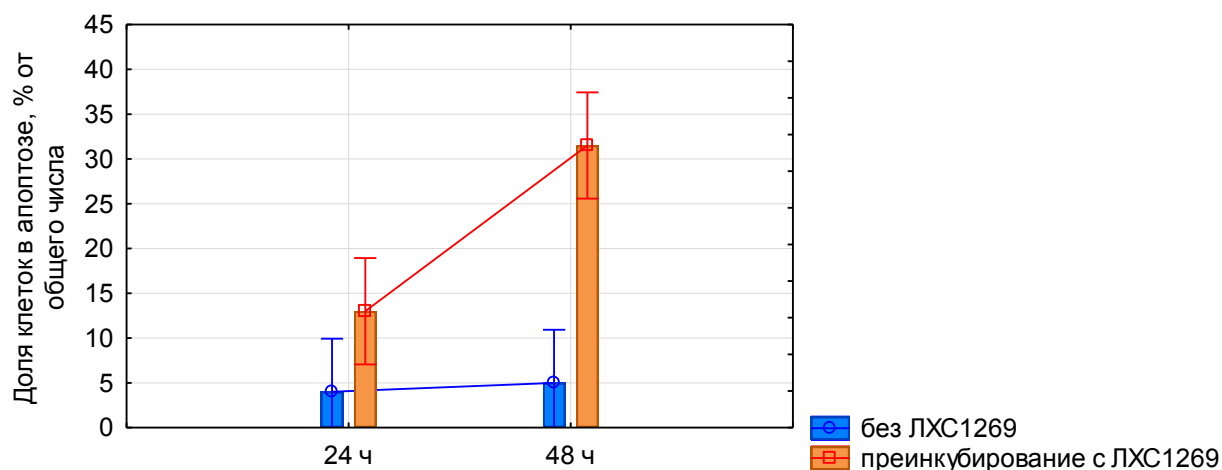
Для проведения данного эксперимента была получена химиорезистентная линия *mel MeR*. Выведение химиорезистентной линии проводили посредством нескольких этапов селекции клеток в среде с аранозой. Предварительно была измерена  $IC_{50}$  аранозы для родительской линии *mel Me*. Каждый этап селекции включал культивирование в течение суток в среде, содержащей аранозу в различных концентрациях, и двух недель культивирования в среде без добавления химиопрепарата. Во время первого этапа селекции клетки были инкубированы с аранозой, находящейся в концентрации  $0,33 \cdot IC_{50}$ . На втором этапе концентрация аранозы составила  $0,67 \cdot IC_{50}$ . На третьем и на четвертом этапе селекции концентрация аранозы составила  $1,33 \cdot IC_{50}$  и  $4 \cdot IC_{50}$ , соответственно. Полученная клеточная линия была резистентной не только к аранозе, но и к стрептозотоцину и цисплатину (Рисунок 25). Родительская линия обладала значительно большей чувствительностью к данным химиопрепаратам.



**Рисунок 25** – Чувствительность клеток линий *mel Me* и *mel MeR* к аранозе, стрептозотоцину и цисплатину

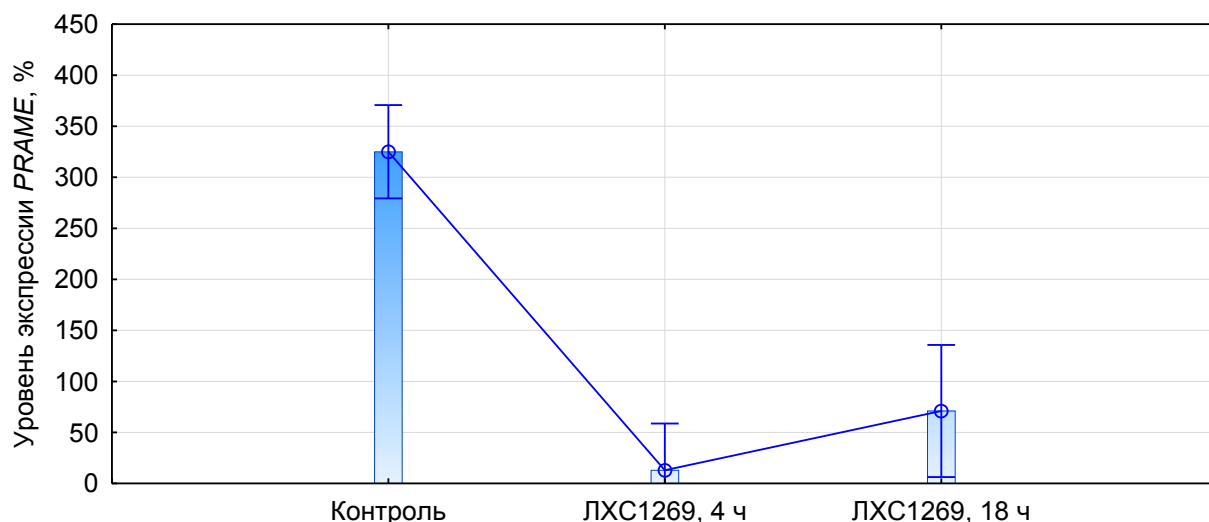
Кроме увеличенной резистентности, *mel MeR* обладала значительно более высоким уровнем экспрессии гена *PRAME* (313%) по сравнению с линией *mel Me* (94%).

В экспериментах по преодолению лекарственной резистентности был испытан перспективный цитостатик из ряда нитрозосоединений – ЛХС1269 [204]. Показано, что данный препарат обладал синергичным эффектом с аранозой. После преинкубирования линии *mel MeR* в течение 30 минут с ЛХС1269 в концентрации  $1 \cdot 10^{-7}$  моль/л, и добавления в среду аранозы в IC50 наблюдали гибель 13% через 24 ч и 30% клеток через 48 ч. В линии *mel MeR*, не преинкубированной с ЛХС1269, в тот же период наблюдения в процессе апоптоза находилось не более 7% клеток (Рисунок 26).



**Рисунок 26** – Эксперимент по преинкубированию клеток *mel MeR* с ЛХС1269 в течение двух суток

Мы провели измерение уровня экспрессии гена *PRAME* в клетках *mel MeR*, инкубированных с ЛХС1269 в течение 4 и 18 ч. Согласно данным ПЦР, уровень экспрессии *PRAME* через 4 ч инкубирования составил 9,47%, и через 18 ч – 75,79% (Рисунок 27).

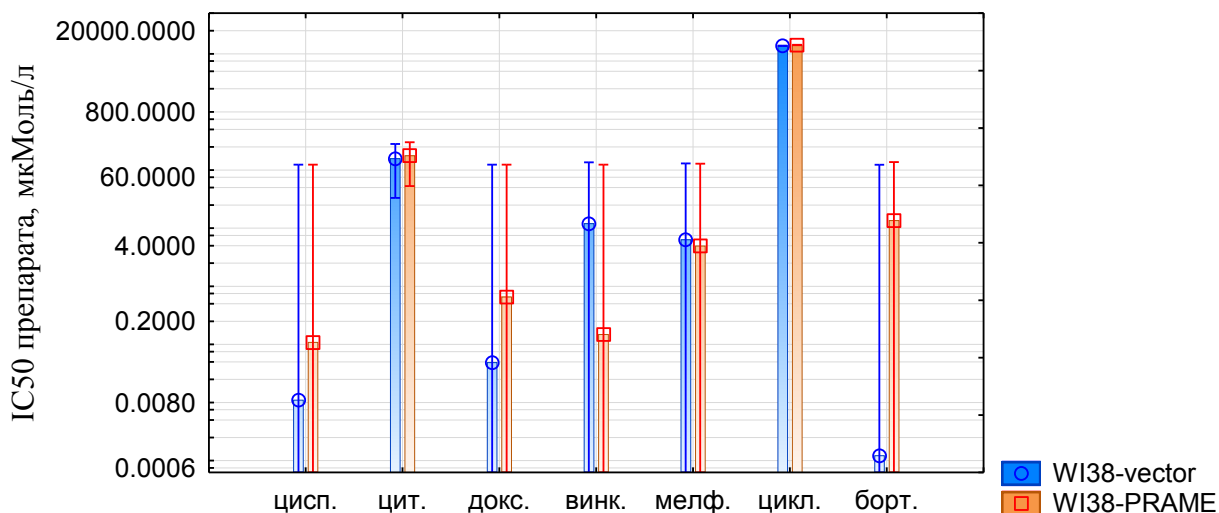


**Рисунок 27** – активность *PRAME* в *mel MeR*, инкубированных с ЛХС1269

Таким образом, в полученной резистентной линии *mel MeR* уровень экспрессии гена *PRAME* увеличился. Преинкубирование линии *mel MeR* с ЛХС1269 приводило к снижению уровня экспрессии *PRAME* и увеличению чувствительности клеток к аранозе, стрептозотоцину и цисплатину.

### 3.1.6. Изменение чувствительности линии клеток WI-38 к химиопрепаратам после активации экспрессии гена *PRAME*

Методом МТТ были получены данные  $IC_{50}$  цисплатина, цитарабина, доксорубицина, винкристина, мелфалана, циклофосфамида и бортезомиба для линий WI-38-vector и WI-38-*PRAME*. В отличие от родительской линии, клетки WI-38-*PRAME* обладали меньшей чувствительностью ко всем химиопрепаратам ( $p < 0,02$  для каждого из них), за исключением винкристина ( $p = 0,0117$ ), что следовало из большей концентрации, необходимой для 50%-ного ингибирования роста (Рисунок 28).



**Рисунок 28** – IC50 химиопрепаратов для WI-38-vector и WI-38-PRAME

### 3.2. Регуляция экспрессии гена *PRAME*

#### 3.2.1. Активация экспрессии *PRAME* в опухолевых клетках в условиях стресса

Согласно нашим наблюдениям, время удвоения клеток линии меланомы A875 составляет примерно 14 часов. Часть клеток погибает спонтанно, но не более 5% в течение суток. Согласно нашим наблюдениям, уровень экспрессии гена *PRAME* остаётся стабильным при длительном культивировании клеток линии A875, если на них не оказывается никакого лекарственного воздействия. Этот уровень колеблется от 4500% до 6000% относительно уровня экспрессии гена «домашнего хозяйства» *ABL*, использованного для количественной оценки экспрессии гена *PRAME*. При добавлении в культуральную среду цитотоксических препаратов часть клеток погибает в течение суток, а уровень экспрессии гена *PRAME* в выживших клетках повышается (Таблица 11).

При добавлении к культуре A875 цисплатина в концентрации 20 мкг/мл в течение суток инкубирования погибло 50% клеток. Уровень экспрессии *PRAME* в выживших клетках превосходил значения, наблюдаемые в контроле, приблизительно в 8 раз, что было статистически значимо ( $p=0,0277$ ).

**Таблица 11** – Активность гена *PRAME* в клетках A875 при различных условиях

Тип воздействия	Уровень экспрессии <i>PRAME</i> в % относительно <i>ABL</i>	Сравнение с контролем, p
Контроль	5308	-
Цисплатин, 20 мкг/мл	42900	0,0277
Бортезомиб, 10 мкг/мл	6990	0,1158
Бортезомиб, 0,4 мкг/мл	6372	0,2864
Дексаметазон, 100 мкг/мл	44941	0,0277
Цисплатин, 20 мкг/мл + Бортезомиб, 10 мкг/мл	22130	0,0277
Цисплатин, 20 мкг/мл + Бортезомиб, 0,4 мкг/мл	21080	0,0464
Цисплатин, 20 мкг/мл + Дексаметазон, 100 мкг/мл	84260	0,0277
Лизат клеток	21680	0,0277

При инкубировании линии A875 в течение суток с бортезомибом в концентрации 10 мкг/мл наблюдали гибель 24% клеток. Уровень экспрессии гена *PRAME* при этом вырос незначительно – до полутора раз по сравнению с контролем, что было статистически незначимо ( $p=0,1158$ ). В случае, когда концентрация бортезомиба составляла 0,4 мкг/мл, активность *PRAME* практически не изменилась. Количество погибших клеток после инкубирования в условиях меньшей концентрации бортезомиба было также меньшим – около 5%.

В следующей серии экспериментов были оценены эффекты комбинации бортезомиба и цисплатина. Добавление цисплатина в концентрации 25 мкг/мл и бортезомиба в концентрации 10 мкг/мл в культуральную среду привело к гибели 69% клеток через 24 часа инкубирования. Активность *PRAME* при этом составила 22130% по отношению к гену *ABL*, что было примерно в 4 раза выше по сравнению с контролем, но статистически значимо ниже по сравнению с воздействием



цисплатина в монорежиме ( $p=0,0303$ ). После инкубации клеток линии A875 с цисплатином в концентрации 25 мкг/мл и бортезомибом в концентрации 0,4 мкг/мл погибла несколько большая доля клеток, чем после инкубации только с цисплатином. Активность гена *PRAME* при этом была несколько ниже, чем после инкубации только с цисплатином.

Мы ожидали, что добавление дексаметазона снизит активность гена *PRAME*. Однако после инкубации клеток линии A875 с дексаметазоном уровень экспрессии *PRAME* увеличился приблизительно в 8 раз по сравнению с контролем ( $p=0,0277$ ). Интересно, что скорость роста клеточной линии выросла примерно на 10% в присутствии дексаметазона.

При добавлении смеси дексаметазона и цисплатина в среду уровень экспрессии *PRAME* вырос примерно в 16 раз по сравнению с контролем. При этом погибло значительно меньше клеток ( $p=0,0277$ ).

Так как цитотоксическое действие сопровождается разрушением клеток, мы проверили, не могут ли компоненты разрушенных клеток (так называемые молекулярные фрагменты, ассоциированные с повреждением, или DAMPs) сами по себе влиять на экспрессию *PRAME* в клетках линии A875. Для этого в клеточный лизат, полученный путём пятикратного замораживания и оттаивания клеток линии A875, добавили в среду к живым клеткам той же линии. Соотношение живых клеток и лизированных составляло 1:1. Через сутки активность гена *PRAME* в живых клетках составила 21680%, что в 4 раза превышало значения, наблюдаемые в контроле ( $p=0,0277$ ), однако было вдвое ниже по сравнению с воздействием цисплатина в концентрации, достаточной для гибели 50% клеток.

### **3.2.2. Определение транскрипционных факторов, регулирующих активность гена *PRAME***

Для определения наиболее значимого регуляторного элемента в последовательности гена *PRAME* опирались на ряд критериев. В последовательности промотора гена должна находиться область, распознаваемая ДНКазой I. В этом же участке промотора должны находиться гистоновые белки, имеющие специфические модификации H3K4Me3 и H3K27Ac, что является

признаком деконденсированного «активного» хроматина. С этим же участком промотора должна связываться ДНК-зависимой РНК полимеразы II. Наконец, в этом же участке промотора должно быть находиться наибольшее количество различных транскрипционных факторов, установленное бионформатическим методом ChIP-seq.

Были обнаружены две области гиперчувствительности к ДНКазе I, пересекающиеся с участками, на которых выявили молекулы модифицированного гистона H3. Эти области расположены в следующих позициях: chr22:22,899,302-22,900,327 (сайт 1) и chr22:22,901,158-22,902,054 (сайт 2). Согласно данным, полученным методом ChIP-seq, сайт 1 является местом посадки для 20, а сайт 2 для 43 различных транскрипционных факторов. Причём наибольшее влияние на уровень экспрессии гена *PRAME* оказывают факторы POLR2A, CTCF1, PHF8, CHD2, POU2F2 и ZNF263 (Таблица 12). Фактор PHF8 представлял особый интерес для дальнейшего изучения, так как для данного белка характерен значительный уровень экспрессии в мужских половых клетках (Рисунок 29).

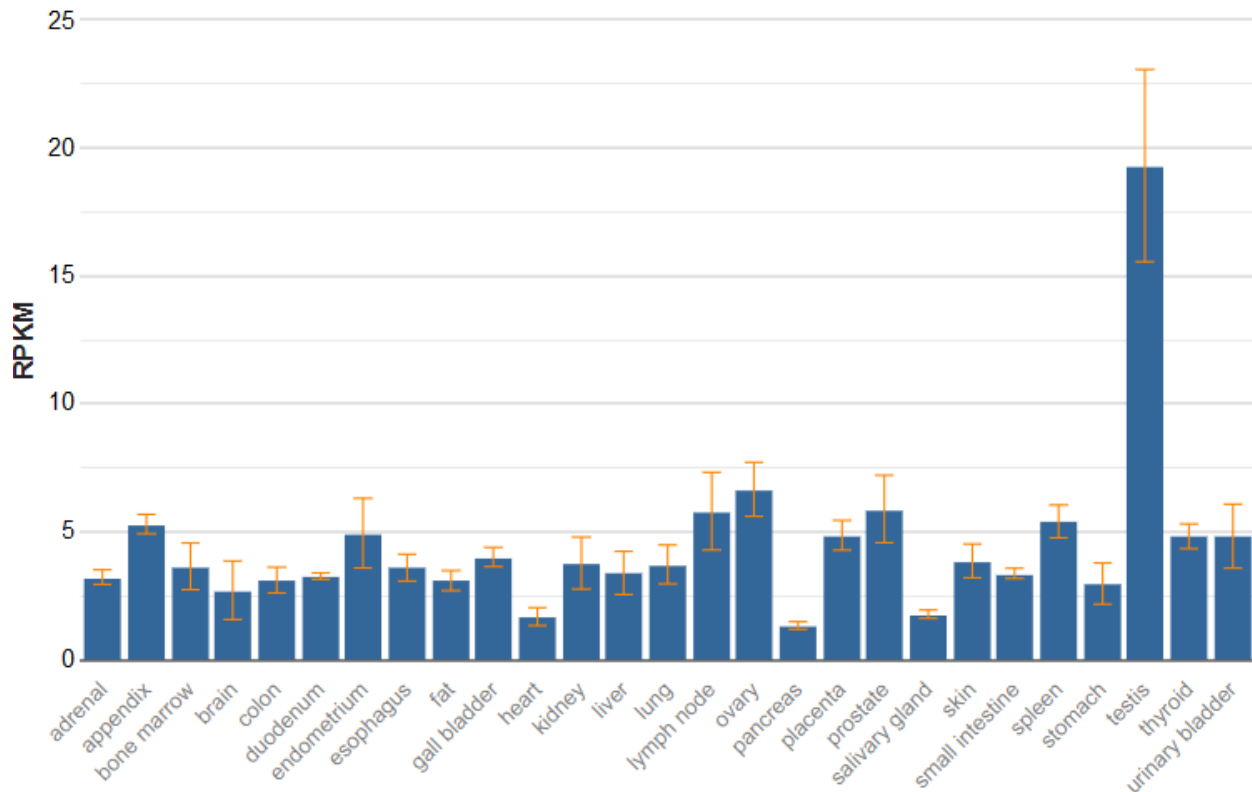
Хотя *PHF8* не относится к раково-тестикулярным генам, для него также характерна спонтанная гиперэкспрессии в опухолевых клетках, в частности при раке печени [205], ОЛЛ взрослых [206], колоректальном раке [207], раке лёгких [208], раке желудка [209], раке простаты [210], раке лёгких [211] и многих других. Фактически, гены *PRAME* и *PHF8* обладают сопоставимым профилем экспрессии. Более того, в ряде заболеваний PHF8 связан с их прогрессией и эпителиально-мезенхимальным переходом.

**Таблица 12** – Транскрипционные факторы, связывающиеся с промотором гена *PRAME*

Транскрипционный фактор	Функции в норме	Значение при онкологических заболеваниях	Расположение последовательности связывания в	Интенсивность связывания, данные ChIP-seq

			промоторе <i>PRAME</i>	
POLR2A	Компонент ДНК-зависимой РНК-полимеразы [212]	Нейтральное	Сайт 1 и 2	
CTCF1	Активация транскрипции антионкогенов p53, p14 ARF, p16Ink и других, репрессия транскрипции онкогенов c-MYC, hTERT, PIM1 и других [213]	Вытесняется фактором BORIS, что приводит к инактивации антионкогенов и активации проонкогенов [213]	Сайт 1	1000

Транскрипционный фактор	Функции в норме	Значение при онкологических заболеваниях	Расположение последовательности связывания в промоторе PRAME	Интенсивность связывания, данные ChIP-seq
RNF8	Деметилирование гистонов [206]	Онкоген при РМЖ [211]	Сайт 1 и 2	1000
CHD2	ДНК-хеликаза [215]	Нейтральное	Сайт 1	1000
POU2F2	Регуляция роста нейронов в эмбриогенезе [216] и созревания лимфоидных клеток [217]	Драйвер при раке простаты [218]	Сайт 2	891
ZNF263	Неизвестно [219]	Неизвестно	Сайт 2	1000
RELA	Компонент провоспалительного сигнального пути NF-κB [220]	Онкоген [221]	Сайт 1	185
MZF1	Регуляция дифференцировки клеток [222]	Онкоген [222]	нет данных	нет данных
BORIS	Регуляция импринтинга [223]	Вытеснение фактора CTCF1 [223]	Сайт 1	нет данных

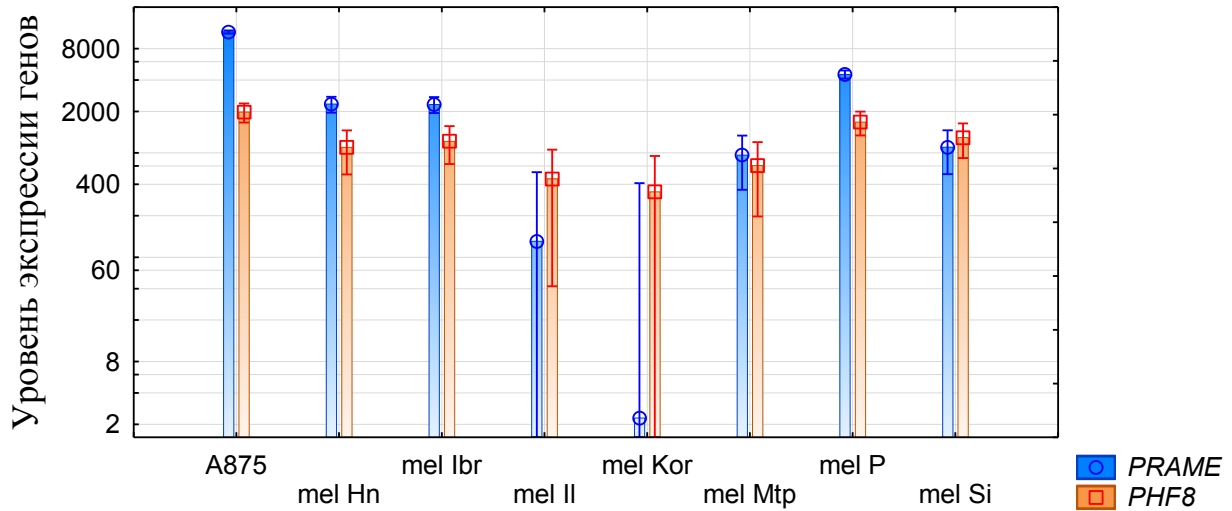


**Рисунок 29** – паттерн экспрессии гена *PNF8* в тканях человека (данные pubmed)

Мы оценили корреляцию экспрессии между генами, кодирующими *CTCF1*, *CHD2* и *PNF8* и геном *PRAME* в бластных клетках, полученных из образцов костного мозга 54 больных ОМЛ. Дополнительно мы исследовали активность генов *MYD88*, *CVID12* и *CVID10*, кодирующих компоненты сигнального пути NF-κB, и гена *MZF1*, ранее упоминавшегося как положительный регулятор экспрессии *PRAME* при меланоме [224]. Было установлено, что активность генов *PRAME* и *MZF1* статистически значимо положительно коррелирует (коэффициент корреляции Пирсона 0,68,  $p=0,00009$ ). Активность остальных исследуемых генов – *CTCF1*, *CHD2*, *PNF8*, *MYD88*, *CVID12* и *CVID10*, оказалась не связана с уровнем экспрессии *PRAME* ( $p>0,05$  для всех случаев).

При исследовании уровня экспрессии генов *PRAME*, *CTCF1*, *CHD2*, *PNF8*, *MYD88*, *CVID12*, *CVID10* и *MZF1* в клеточных линиях меланомы mel Hn, mel Ibr, mel Il, mel Kor, mel Mtp, mel P, mel Si и A875 было установлено, что активность *PRAME* коррелирует с уровнем экспрессии гена *PNF8* ( $p=0,0021$ ), и не коррелирует

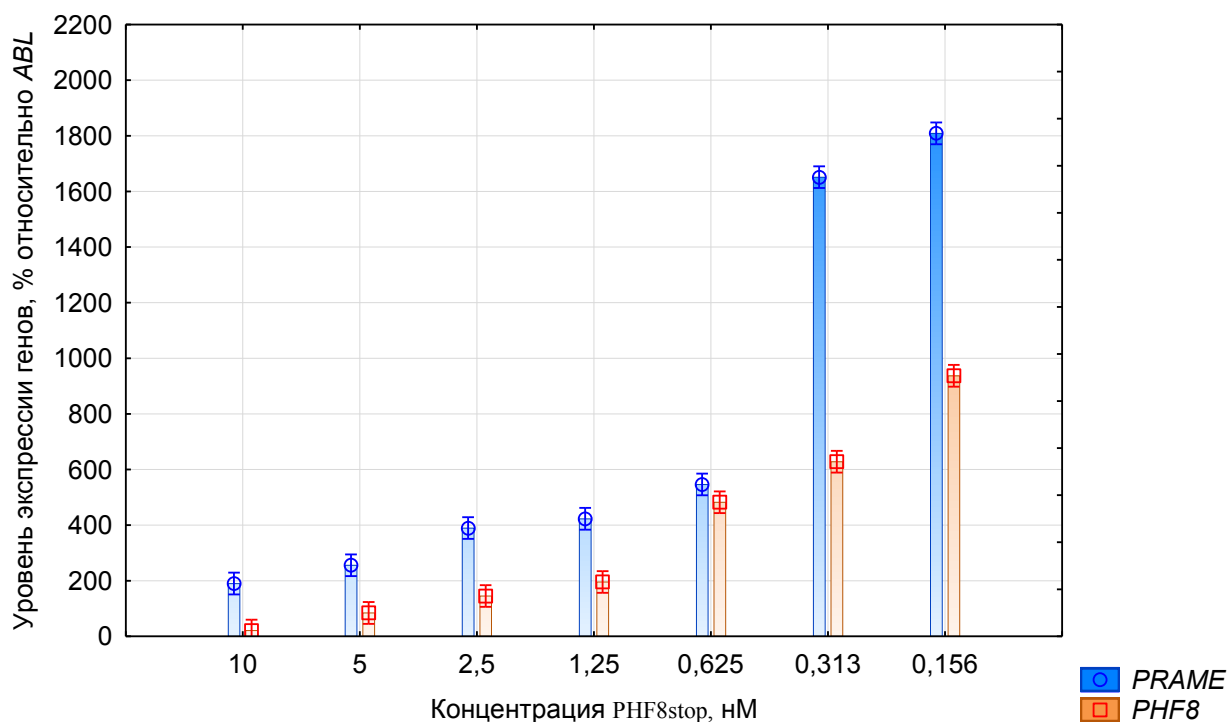
с уровнем экспрессии генов *CTCF1*, *CHD2*, *MYD88*, *CVID12*, *CVID10* и *MZF1* (Рисунок 30,  $p > 0,05$  для всех остальных случаев).



**Рисунок 30** – Активность генов *PRAME* и *PHF8* в клетках различных линий меланомы

### 3.2.3. Использование тиопроизводных олигонуклеотидов для блокирования экспрессии гена *PHF8*

Для нокаута гена *PHF8* был создан тиопроизводный олигонуклеотид с последовательностью GACGATAGCGCAGCTCCTATTCATT, названный нами PHF8stop. Последовательность этого олигонуклеотида комплементарна стартовому кодону и месту стыка первого и второго экзона в зрелой мРНК гена *PHF8*. Особенности PHF8stop позволяли данному олигонуклеотиду образовывать дуплекс с мРНК *PHF8* и препятствовать синтезу белка. Мы проводили инкубация PHF8stop в различных концентрациях в среде, содержащей клетки меланомы A875 в течение суток. Воздействие PHF8stop дозозависимо снижало уровень экспрессии целевого гена *PHF8* (Рисунок 31,  $p < 0,0001$ ). Вместе с *PHF8* наблюдалось снижение уровня экспрессии гена *PRAME*.



**Рисунок 31** – активность генов *PHF8* и *PRAME* в клетках A875 после инкубирования с PHF8stop

### 3.3. Прогностическая значимость экспрессии *PRAME* у больных солидными опухолями

Сервис GEPiA содержит данные профиля экспрессии тысяч генов, и позволяет проводить их изучение даже тем, кто не владеет навыками биоинформатического анализа [186].

Основываясь на результатах транскриптомного анализа образцов опухолевых тканей, мы провели исследование по определению прогностической значимости экспрессии *PRAME* у больных различными онкологическими заболеваниями.

При работе с клинической информацией, загруженной из базы данных GEPiA, было получено множество графиков с кривыми выживаемости. Данные, отражённые на этих графиках, были преобразованы нами для представления в виде таблиц, содержащих значения двухлетней ОВ и БСВ, медианы ОВ и БСВ, значения cut-off и р-критерия в зависимости от уровня экспрессии *PRAME*. Представлены данные для характеристики ОВ (Таблица 13, Рисунки 32-42) и БСВ (Таблица 14, Рисунки 43-47).

Согласно нашим наблюдениям, высокий уровень экспрессии *PRAME* статистически значимо связан с ухудшением параметров ОБ у больных АКР, РМЖ, РТК, ПРГШ, ПРК, СККП, АЛ, АКПЖ, МК и КМ. При ХК и УМ высокий уровень экспрессии *PRAME* связан с тенденцией к ухудшению параметров ОБ (Таблица 1, стр.35).

Кроме этого, высокий уровень экспрессии гена статистически значимо связан с ухудшением параметров БСВ у больных АКР, РМЖ, ПКР, СККП, РЭ и УМ. При этом высокий уровень экспрессии *PRAME* связан с тенденцией к ухудшению параметров БСВ при РМП, АКШМ, АЛ, РПЖ и РЖ (Таблица 14).

Установлено также, что высокий уровень экспрессии *PRAME* связан со статистически значимым улучшением параметров ОБ у больных ПРЛ, МП и КМ, а также статистически значимым улучшением параметров БСВ у больных РЭ (Таблица 14). У больных с диагнозами ОМЛ и СЦАК наблюдался тенденция к улучшению ОБ в случае высокого уровня экспрессии *PRAME* (Таблица 13).

**Таблица 13** – Общая выживаемость больных в зависимости от уровня экспрессии гена *PRAME*

Заболевање	Гипер-экспрессия <i>PRAME</i> , 2х-летняя ОБ, %	Низкий уровень экспрессии <i>PRAME</i> , 2х-летняя ОБ, %	Гипер-экспрессия <i>PRAME</i> , медиана ОБ, мес.	Низкий уровень экспрессии <i>PRAME</i> , медиана ОБ, мес.	Групповой cut-off, %	p
АКР, n=77	66	86	58	Не достигнута	65	<b>0,011</b>
РМП, n=400	52	63	26	41	55	0,33
РМЖ, n=1066	92	96	121	142	55	<b>0,018</b>

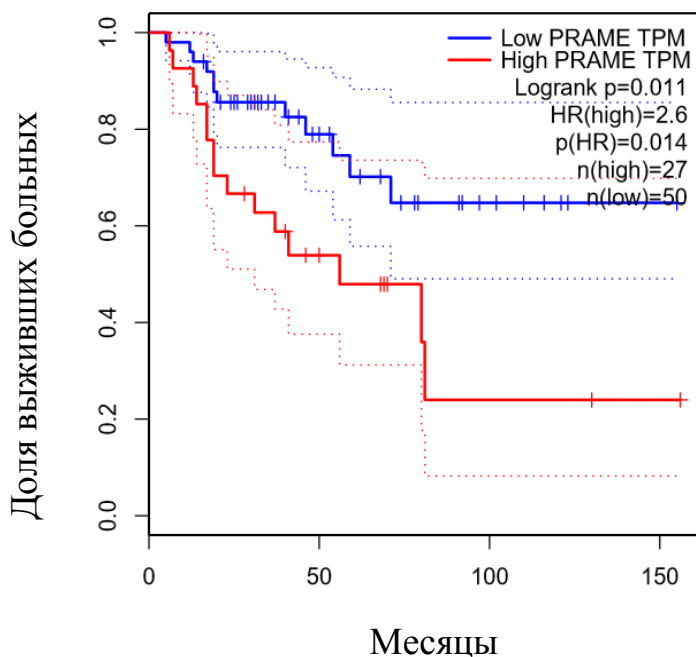


Заболевание	Гиперэкспрессия <i>PRAME</i> , 2х-летняя ОВ, %	Низкий уровень экспрессии <i>PRAME</i> , 2х-летняя ОВ, %	Гиперэкспрессия <i>PRAME</i> , медиана ОВ, мес.	Низкий уровень экспрессии <i>PRAME</i> , медиана ОВ, мес.	Групповой cut-off, %	p
АКШМ, n=292	77	86	97	Не достигнута	50	0,18
ХК, n=36	27	73	22	46	65	0,072
РТК, n=270	78	86	64	96	60	<b>0,047</b>
ДБКЛ, n=46	77	89	124	221	70	0,13
РП, n=182	58	55	28	27	50	0,43
МГ, n=156	18	28	19	19	50	0,42
ПРГШ, n=518	57	70	33	73	70	<b>0,00061</b>
ХРП, n=58	88	100	Не достигнута	Не достигнута	50	0,1
ПРП, n=517	78	88	69	Не достигнута	60	<b>0,00011</b>
СККП, n=283	80	91	99	Не достигнута	80	<b>0,041</b>
ОМЛ, n=106	64	53	55	26	65	0,094
ГГМ, n=514	80	88	72	97	65	0,079
ГЦР, n=354	67	76	47	71	55	0,058

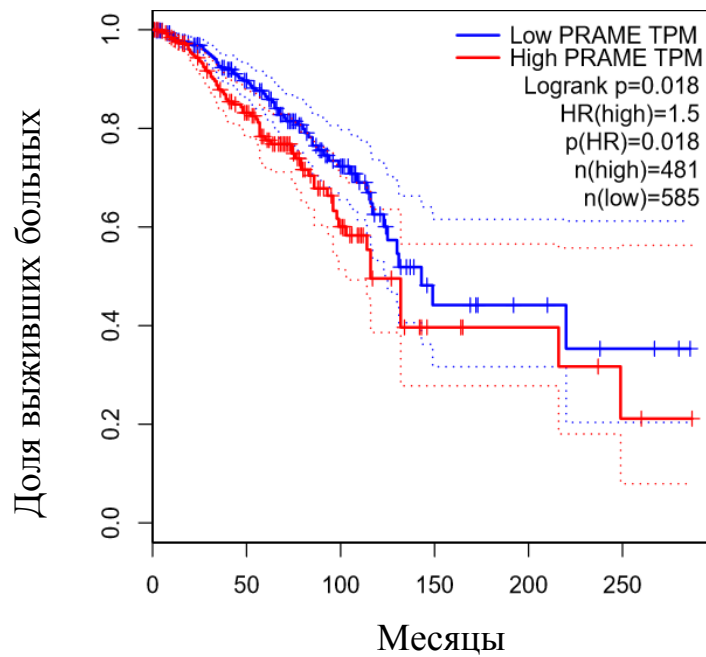
Продолжение таблицы 13

Заболевание	Гиперэкспрессия <i>PRAME</i> , 2х-летняя ОВ, %	Низкий уровень экспрессии <i>PRAME</i> , 2х-летняя ОВ, %	Гиперэкспрессия <i>PRAME</i> , медиана ОВ, мес.	Низкий уровень экспрессии <i>PRAME</i> , медиана ОВ, мес.	Групповой cut-off, %	p
АЛ, n=476	72	77	44	60	35	<b>0,044</b>
ПРЛ, n=383	73	58	50	43	40	<b>0,042</b>
МП, n=81	61	28	28	16	60	0,0088
СЦАК, n=425	78	72	50	43	45	0,065
АКПЖ, n=178	29	52	59	Не достигнута	65	<b>0,04</b>
РПЖ, n=469	98	96	121	Не достигнута	45	0,67
КР, n=90	90	78	59	Не достигнута	55	0,59
СМТ, n=256	73	78	65	81	50	0,27
МК, n=459	76	86	68	104	35	<b>0,031</b>
РЖ, n=384	53	60	27	47	50	0,41
ОЗК, n=136	97	96	Не достигнута	Не достигнута	50	0,49
РЦЖ, n=429	98	99	Не достигнута	Не достигнута	50	0,92

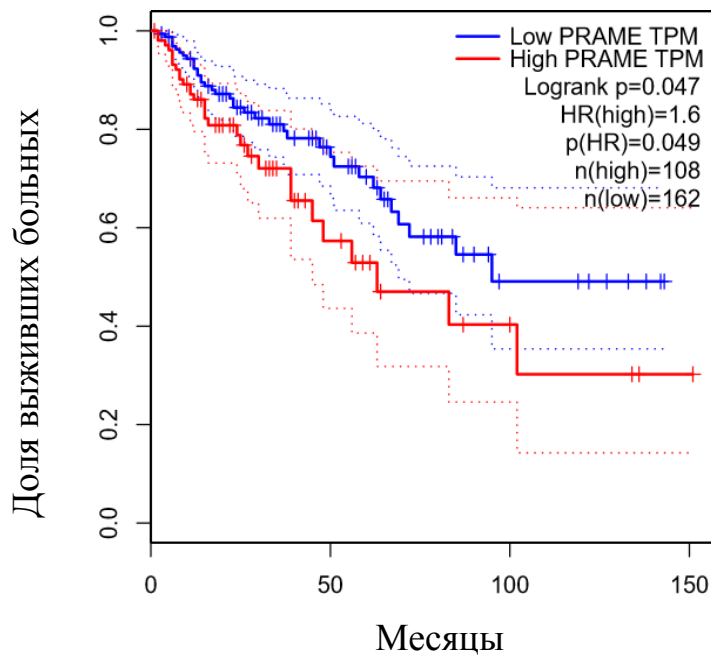
Заболевание	Гиперэкспрессия <i>PRAME</i> , 2х- летняя ОВ, %	Низкий уровень экспрессии <i>PRAME</i> , 2х- летняя ОВ, %	Гиперэкспрессия <i>PRAME</i> , медиана ОВ, мес.	Низкий уровень экспрессии <i>PRAME</i> , медиана ОВ, мес.	Групповой cut-off, %	p
Т, n=118	96	99	Не достигнута	Не достигнута	50	0,53
РЭ, n=172	87	87	112	Не достигнута	50	0,17
КМ, n=56	63	32	51	19	35	<b>0,016</b>
УМ, n=78	81	86	47	53	45	0,082



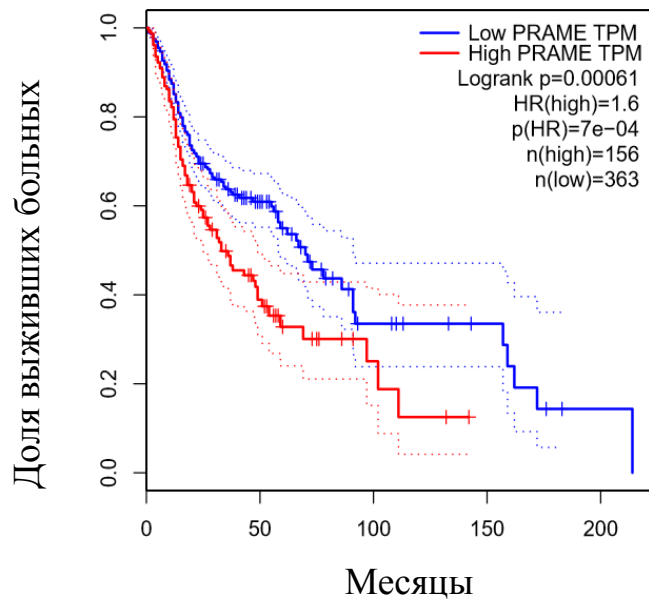
**Рисунок 32** – Общая выживаемость больных адренокортикальным раком статистически значимо ниже при высоком уровне экспрессии *PRAME* (p=0,011)



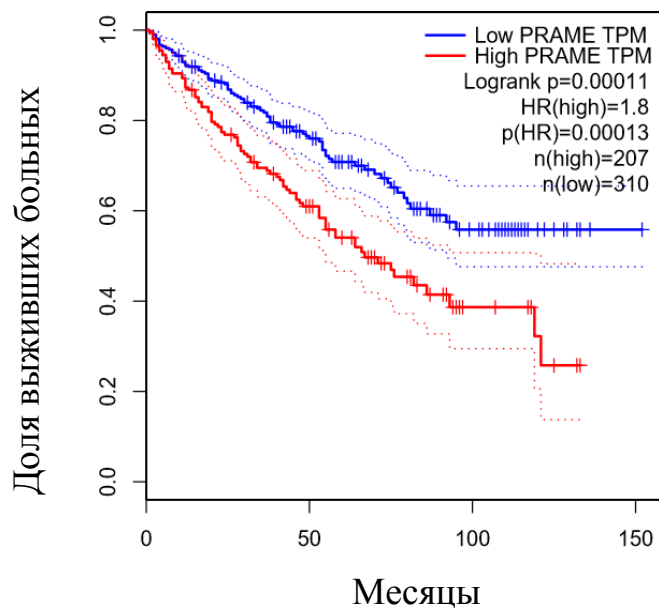
**Рисунок 33** – Общая выживаемость больных раком молочной железы статистически значимо ниже при высоком уровне экспрессии *PRAME* ( $p=0,018$ )



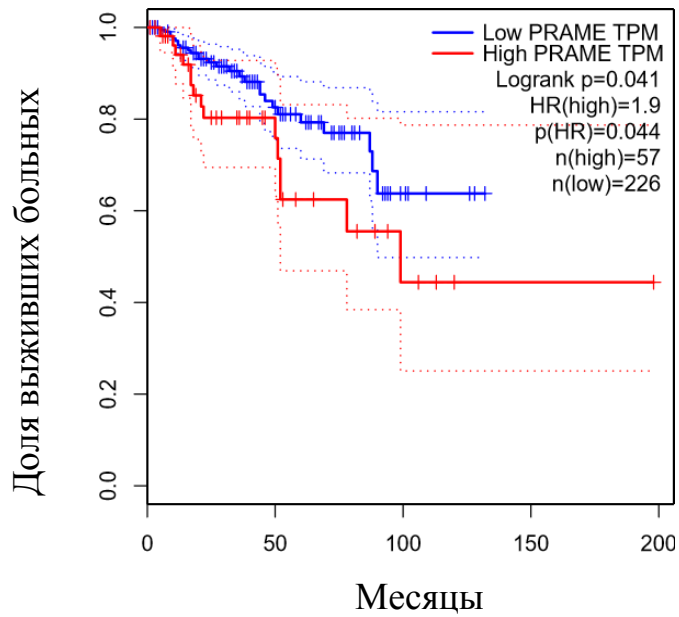
**Рисунок 34** – Общая выживаемость больных раком толстой кишки статистически значимо ниже при высоком уровне экспрессии *PRAME* ( $p=0,047$ )



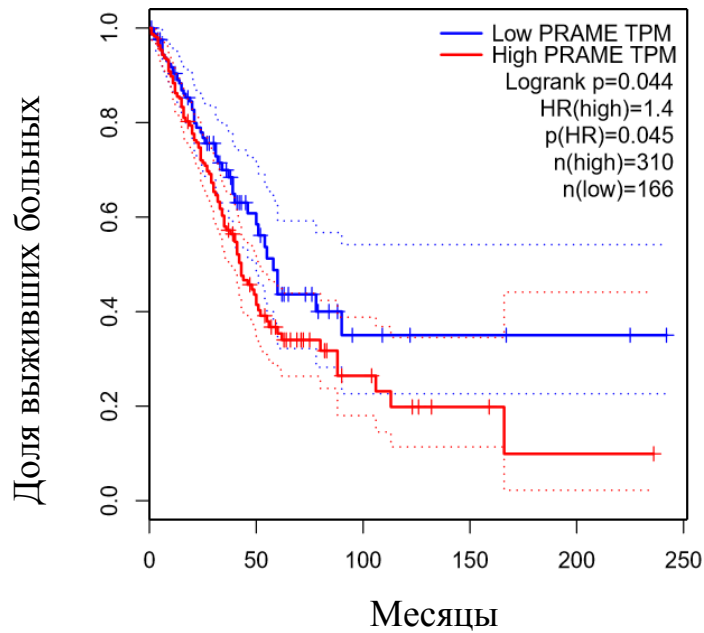
**Рисунок 35** – Общая выживаемость больных плоскоклеточным раком головы и шеи статистически значимо ниже при высоком уровне экспрессии *PRAME* ( $p=0,00061$ )



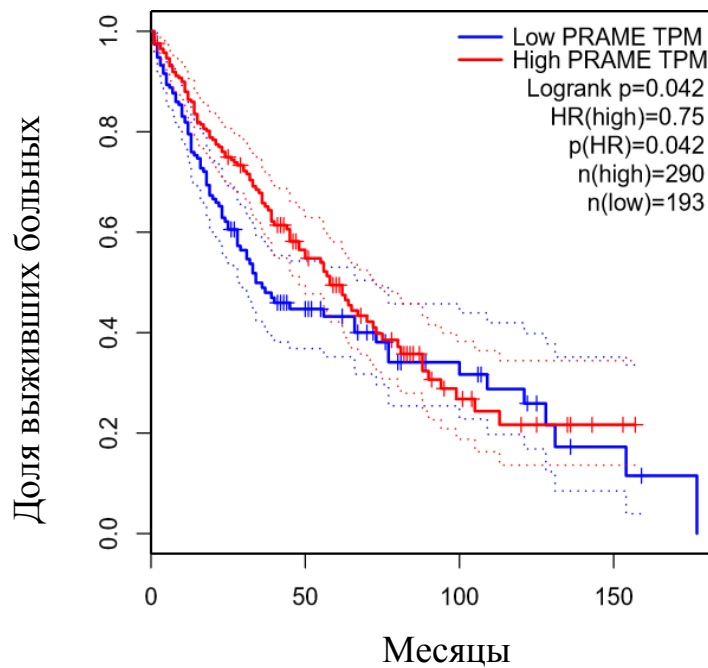
**Рисунок 36** – Общая выживаемость больных папиллярным раком почки статистически значимо ниже при высоком уровне экспрессии *PRAME* ( $p=0,00011$ )



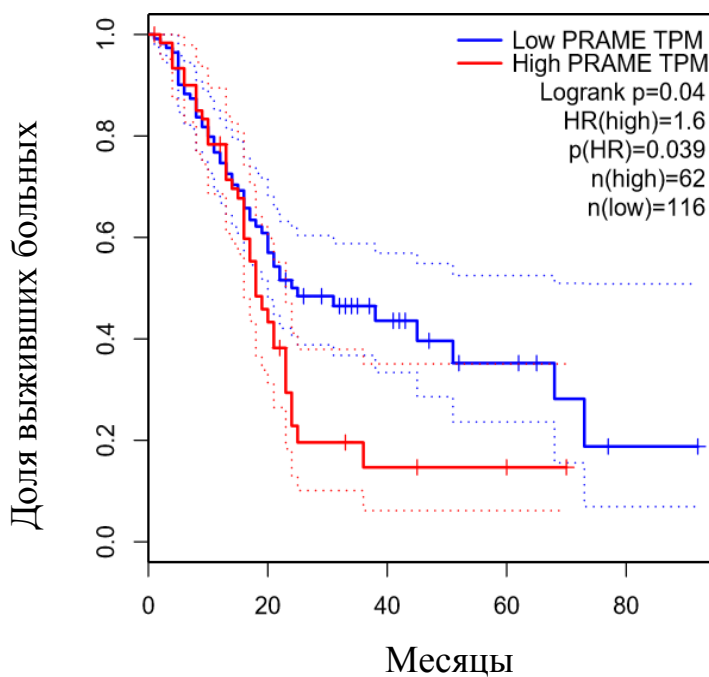
**Рисунок 37** – Общая выживаемость больных светлоклеточной карциномой почек статистически значимо ниже при высоком уровне экспрессии *PRAME* ( $p=0,044$ )



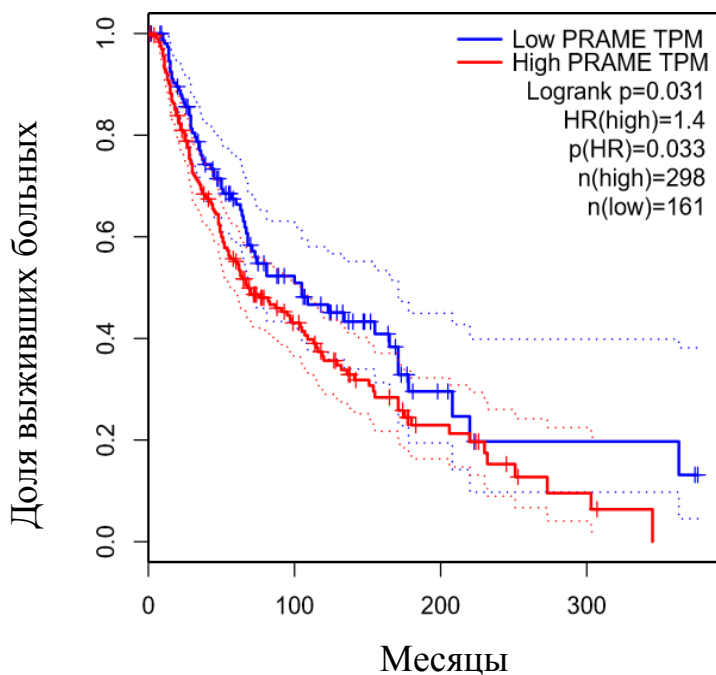
**Рисунок 38** – Общая выживаемость больных аденокарциномой лёгкого статистически значимо ниже при высоком уровне экспрессии *PRAME* ( $p=0,044$ )



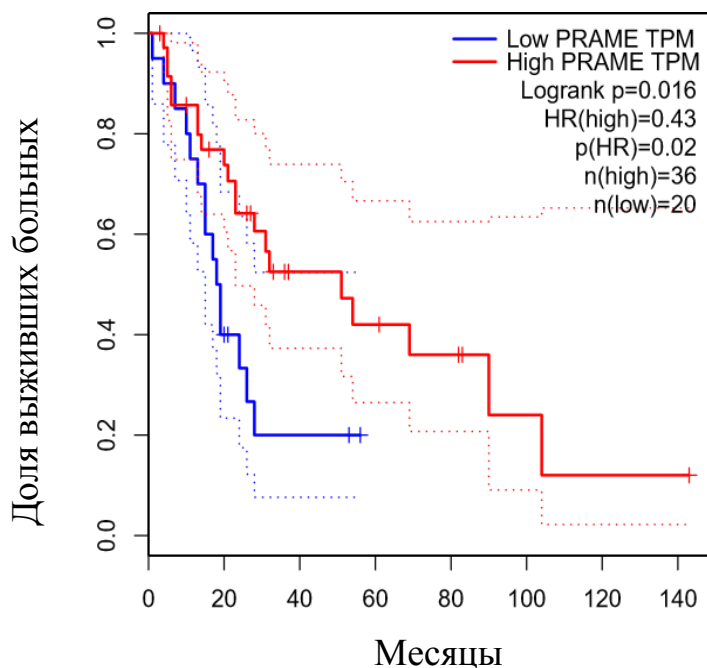
**Рисунок 39** – Общая выживаемость больных плоскоклеточным раком легкого статистически значимо ниже при высоком уровне экспрессии *PRAME* ( $p=0,042$ )



**Рисунок 40** – Общая выживаемость больных аденокарциномой поджелудочной железы статистически значимо ниже при высоком уровне экспрессии *PRAME* ( $p=0,04$ )



**Рисунок 41** – Общая выживаемость больных плоскоклеточным раком легкого статистически значимо ниже при высоком уровне экспрессии *PRAME* ( $p=0,031$ )



**Рисунок 42** – Общая выживаемость больных карциносаркомой матки статистически значимо ниже при низком уровне экспрессии *PRAME* ( $p=0,016$ )



**Таблица 14** – Бессобытийная выживаемость больных в зависимости от уровня экспрессии гена *PRAME*

Заболевание	Гипер-экспрессия <i>PRAME</i> , 2х-летняя БСВ, %	Низкий уровень экспрессии <i>PRAME</i> , 2х-летняя БСВ, %	Гипер-экспрессия <i>PRAME</i> , медиана БСВ, мес.	Низкий уровень экспрессии <i>PRAME</i> , медиана БСВ, мес.	Групповой cut-off, %	p
АКР, n=77	47	75	20	Не достигнута	45	<b>0,0004</b>
РМП, n=400	55	68	33	78	55	0,091
РМЖ, n=1066	89	94	Не достигнута	173	60	<b>0,017</b>
АКШМ, n=292	72	84	Не достигнута	Не достигнута	65	0,057
ХК, n=36	56	27	Не достигнута	Не достигнута	60	0,3
РТК, n=270	71	80	75	Не достигнута	50	0,12
ДБКЛ, n=46	100	75	Не достигнута	124	85	0,15
РП, n=182	45	57	18	27	50	0,14
МГ, n=156	17	26	8	8	55	0,68

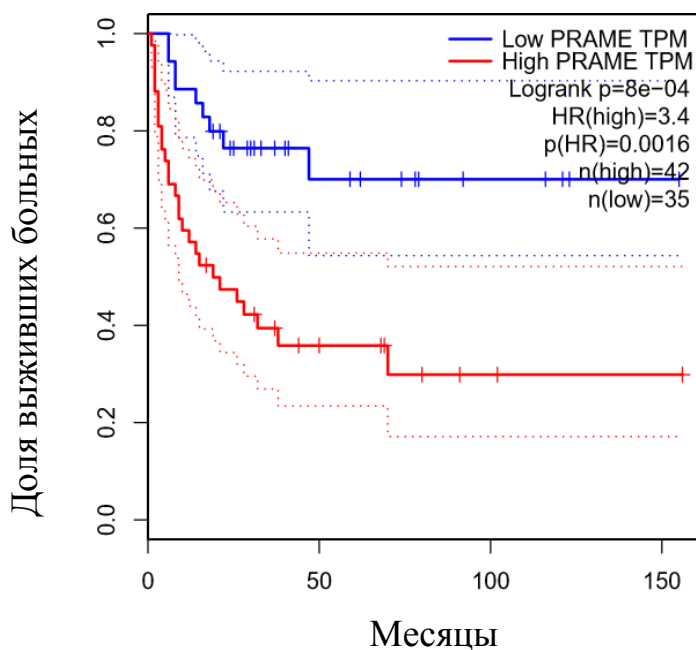
Продолжение таблицы 14

Заболевание	Гипер-экспрессия <i>PRAME</i> , 2х-летняя БСВ, %	Низкий уровень экспрессии <i>PRAME</i> , 2х-летняя БСВ, %	Гипер-экспрессия <i>PRAME</i> , медиана БСВ, мес.	Низкий уровень экспрессии <i>PRAME</i> , медиана БСВ, мес.	Групповой cut-off, %	p
ПРГШ, n=518	74	72	Не достигнута	Не достигнута	55	0,77
ХРП, n=58	81	93	Не достигнута	Не достигнута	55	0,2
ПРП, n=517	68	91	92	127	55	<b>0,00001</b>
СККП, n=283	72	86	105	Не достигнута	80	0,016
ОМЛ, n=106	100	100	Не достигнута	Не достигнута	нет	1
ГГМ, n=514	67	71	42	62	65	0,15
ГЦР, n=354	53	45	30	23	50	0,75
АЛ, n=476	56	67	38	23	30	0,068
ПРЛ, n=383	74	71	98	76	55	0,34
МП, n=81	26	27	19	16	60	0,554

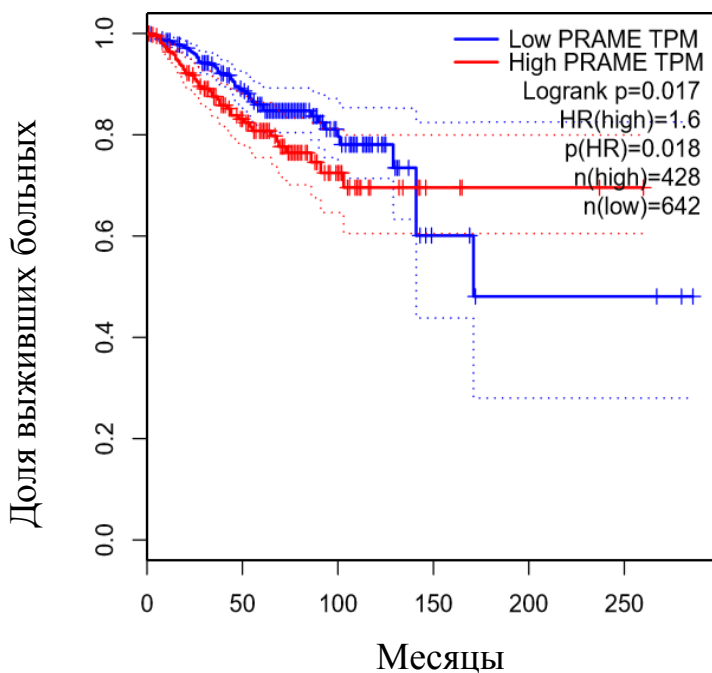
Продолжение таблицы 14

Заболевание	Гиперэкспрессия <i>PRAME</i> , 2х-летняя БСВ, %	Низкий уровень экспрессии <i>PRAME</i> , 2х-летняя БСВ, %	Гиперэкспрессия <i>PRAME</i> , медиана БСВ, мес.	Низкий уровень экспрессии <i>PRAME</i> , медиана БСВ, мес.	Групповой cut-off, %	p
СЦАК, n=425	41	42	23	21	25	0,21
АКПЖ, n=178	35	49	17	25	65	0,14
РПЖ, n=469	80	89	83	Не достигнута	60	0,053
КР, n=90	77	87	121	Не достигнута	45	0,057
СМТ, n=256	60	51	40	26	65	0,41
МК, n=459	60	68	43	54	25	0,44
РЖ, n=384	57	73	46	Не достигнута	40	0,064
ОЗК, n=136	83	69	Не достигнута	Не достигнута	35	0,38
РЦЖ, n=429	89	92	Не достигнута	Не достигнута	45	0,1

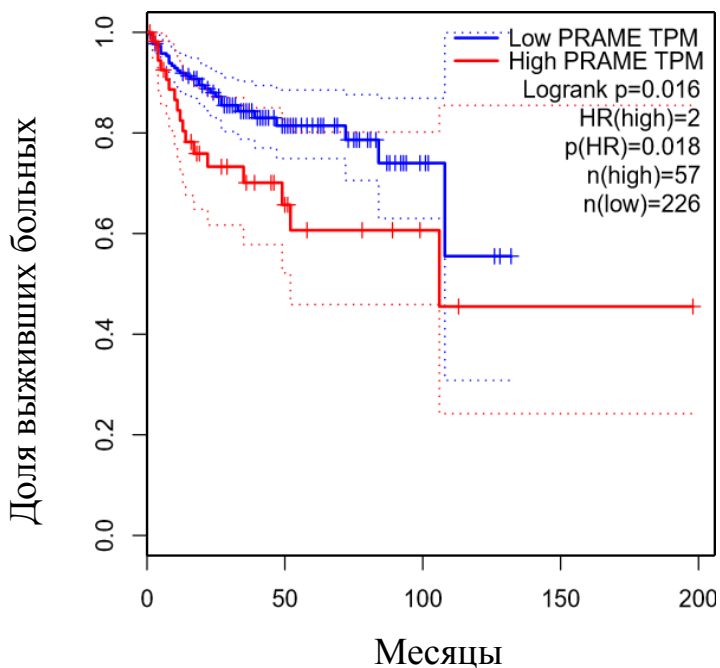
Заболевание	Гипер-экспрессия <i>PRAME</i> , 2х-летняя БСВ, %	Низкий уровень экспрессии <i>PRAME</i> , 2х-летняя БСВ, %	Гипер-экспрессия <i>PRAME</i> , медиана БСВ, мес.	Низкий уровень экспрессии <i>PRAME</i> , медиана БСВ, мес.	Групповой cut-off, %	p
Т, n=118	91	88	Не достигнута	Не достигнута	50	0,66
РЭ, n=172	79	70	Не достигнута	71	45	<b>0,013</b>
КМ, n=56	53	Н/Д	31	17	35	0,26
УМ, n=78	53	92	33	53	60	<b>0,00067</b>



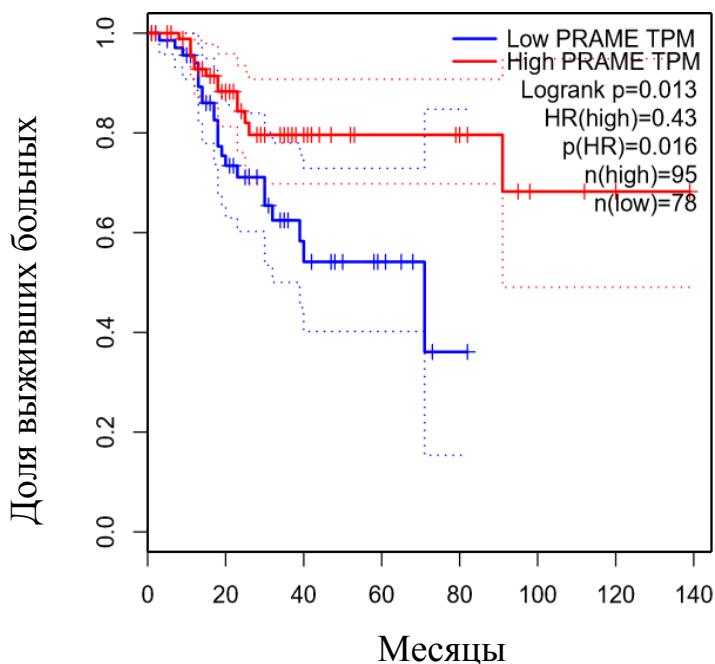
**Рисунок 43** – Бессобытийная выживаемость больных аденокарциномой статистически значимо ниже при высоком уровне экспрессии *PRAME* (p=0,0004)



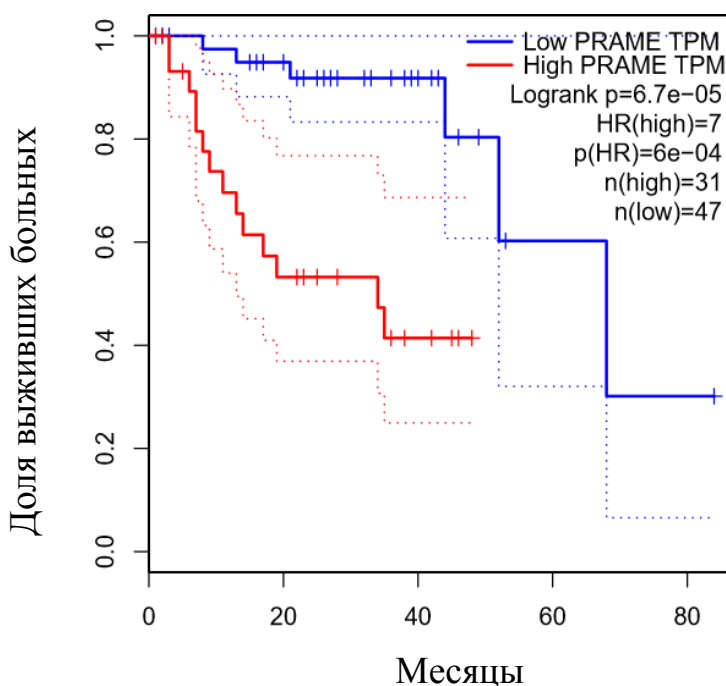
**Рисунок 44** – Бессобытийная выживаемость больных раком молочной железы статистически значимо ниже при высоком уровне экспрессии *PRAME* ( $p=0,017$ )



**Рисунок 45** – Бессобытийная выживаемость больных папиллярным раком почки статистически значимо ниже при высоком уровне экспрессии *PRAME* ( $p=0,016$ )



**Рисунок 46** – Бессобытийная выживаемость больных раком эндометрия статистически значимо ниже при высоком уровне экспрессии *PRAME* ( $p=0,013$ )



**Рисунок 47** – Бессобытийная выживаемость больных увеальной меланомой статистически значимо ниже при высоком уровне экспрессии *PRAME* ( $p=0,000067$ )

При анализе паттерна экспрессии генов мы установили, что в тех случаях, когда заболевание имеет неблагоприятный прогноз, рассчитанный по параметрам выживаемости в зависимости от уровня экспрессии *PRAME*, с наибольшей частотой наблюдается его коэкспрессия вместе с генами *ADAMTS2*, *CTAG2*, *FAM69B*,

*FAR2P2* и *MAGEA2B*. Гены *DUSP9*, *KIF25-AS1*, *MAGEA9*, *MAGEA9B*, *RNASEH1P1*, *RP11-505E24.2* и *SPATA31C1* коэкспрессируются с *PRAME* при тех заболеваниях, когда активность *PRAME* связана с большим временем ОБ и БСВ. В случаях, когда не было выявлено какой-либо корреляции между экспрессией *PRAME* и параметрами выживаемости, выявлялась экспрессия других генов – *LL22NC03-63E9.3*, *MAGEF1*, *MAGEA9*, *SALL2*, *SLC6A10P* *ZNF280A*, *ZNF280B* и *ZNF74*.

### **3.4. Прогностическая значимость экспрессии *PRAME* у больных онкогематологическими заболеваниями**

#### **3.4.1. Фолликулярная лимфома**

На основании анализа данных о больных ФЛ у большинства из них (22/26) выявлена генерализованная (III–IV) стадия заболевания по классификации Ann-Arbor, у 4/26 – I-II стадия. Более чем в половине случаев поражённые лимфатические узлы образовывали массивные конгломераты – 12/22 (55%). Поражение костного мозга выявлено у значительной доли больных – 18/32 (56%). Опухолевая популяция клеток ФЛ в периферической крови (лейкемизация ФЛ) определялась у 6 (21%) из 29 больных.

Активность гена *PRAME* хотя бы в одном из исследованных биологических образцов обнаруживалась у 22 (64%) из 34 больных. Наиболее часто экспрессия гена *PRAME* выявлялась при исследовании лимфатических узлов в сравнении с образцами крови или костного мозга. Величина экспрессии данного гена была наибольше в опухолевых лимфатических узлах, по сравнению с кровью ( $p=0,0437$ ) и костным мозгом ( $p=0,0186$ ). В 2 из 8 реактивных лимфатических узлов, составлявших группу контроля, отмечалась экспрессия *PRAME*, однако величина экспрессии была значительно более низкой по сравнению с лимфатическими узлами, поражёнными ФЛ ( $p=0,0368$ , Таблица 15). В контрольных образцах крови и костного мозга экспрессия *PRAME* не определялась совсем.

Следует отметить, что в рутинной клинической практике не проводится оценка наличия минимальной диссеминированной болезни у всех больных ФЛ с помощью высокочувствительных методов, таких, как проточная цитофлуориметрия. Тем не менее, в случае наличия лейкоцитоза в периферической

крови, врач может заподозрить лейкемическую фазу ФЛ и подтвердить это с помощью иммунофенотипирования субпопуляций лимфоцитов. Согласно полученным нами данным, у больных с признаками лейкемизации ФЛ в образцах периферической крови также выявлялась экспрессия гена *PRAME* ( $p=0,0357$ ). Также отмечена значимая связь экспрессии гена *PRAME* с наличием вовлечения костного мозга, подтвержденного гистологическим исследованием ( $p=0,0034$ ). Таким образом, наличие экспрессии гена *PRAME* отражало факт диссеминации заболевания и служило молекулярным маркером опухолевого поражения.

При анализе связи экспрессии гена *PRAME* с клиническими параметрами больных ФЛ не было выявлено зависимости между тенденцией к образованию опухолевых конгломератов, цитологическим типом, соматическим статусом по шкале ECOG и экспрессией *PRAME* в лимфатическом узле ( $p=0,5967$ ,  $p=0,2026$  и  $p=0,3327$ , соответственно). Однако, с помощью уравнений множественной линейной регрессии была выявлена прямая связь экспрессии *PRAME* в лимфатическом узле с более высокими значениями индекса пролиферативной активности Ki67, что отражает более агрессивное клиническое течение заболевания в случае активности гена *PRAME* в опухолевых клетках ФЛ ( $p=0,043$ ).

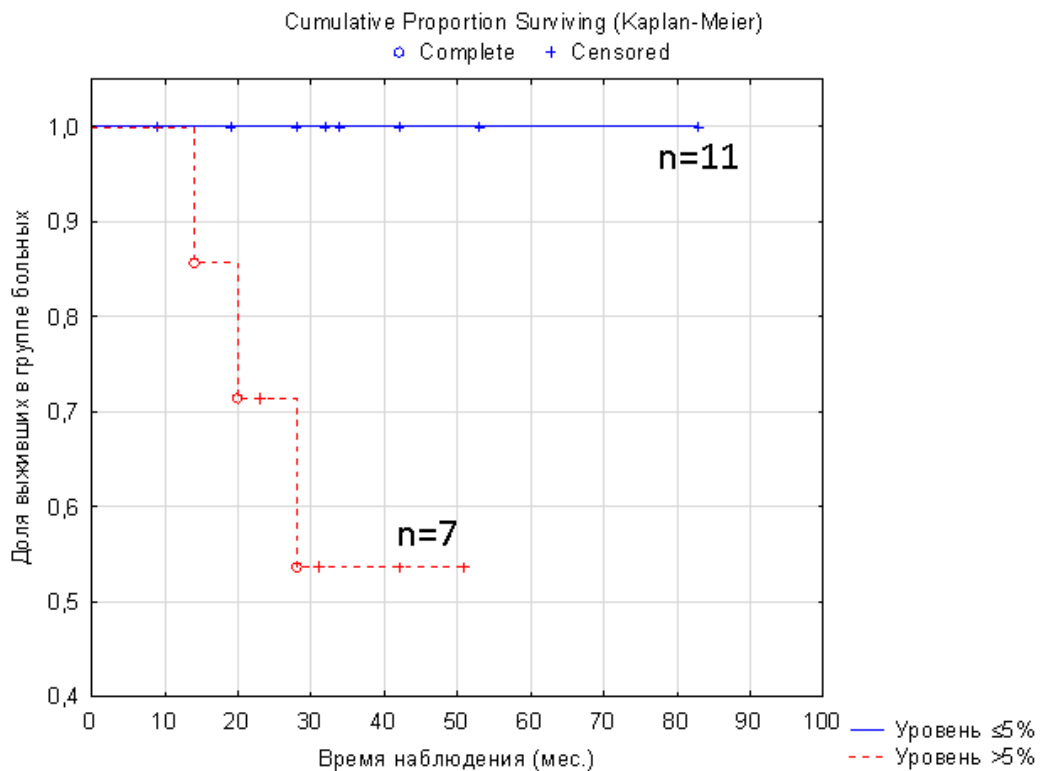
Не было выявлено зависимости в частоте достижения полных ремиссий в зависимости от уровня экспрессии *PRAME* ( $p=0,7858$ ).

Медиана срока наблюдения составила 29 месяцев (6–53 мес.). Статистически значимая связь между уровнем экспрессии *PRAME* и параметрами выживаемости была выявлена в отношении экспрессии *PRAME* в лимфатическом узле, для экспрессии *PRAME* в костном мозге и периферической крови такой связи выявлено не было. Так, общая выживаемость была значимо ниже в группе больных с экспрессией гена *PRAME* в лимфоузле выше 5% (*PRAME*<sup>high</sup>,  $n=7$ ) по сравнению с больными, уровень экспрессии *PRAME* у которых не превышал 5% (группа *PRAME*<sup>low</sup>,  $n=11$ ),  $p=0,0402$  (Рисунок 48).



**Таблица 15** – Параметры экспрессии гена *PRAME* в различных биоматериалах больных фолликулярной лимфомой (лимфатические узлы, кровь, костный мозг)

Группа	Частота обнаружения активного <i>PRAME</i> , %	Уровень экспрессии <i>PRAME</i> , медиана, разброс	Значение $p$ при сравнении с активностью в лимфатических узлах больных ФЛ
Лимфатический узел (контроль)	25	0,92 (0,05–1,79)	0,0368
Лимфатический узел (больные ФЛ)	65	7,28 (0,42–151)	-
Костный мозг (больные ФЛ)	42	0,25 (0,08–10,15)	0,0186
Кровь (больные ФЛ)	86	2,16 (0,1–23,3)	0,0437



**Рисунок 48** – Общая выживаемость больных фолликулярной лимфомой с различным уровнем экспрессии гена *PRAME* в лимфатических узлах ( $p=0,0402$ )

Мы сопоставили между собой клинические признаки, которые учитываются при определении значения индексов FLIPI-1 и FLIPI-2, у больных в группах  $PRAME^{low}$  и  $PRAME^{high}$  (Таблица 16).

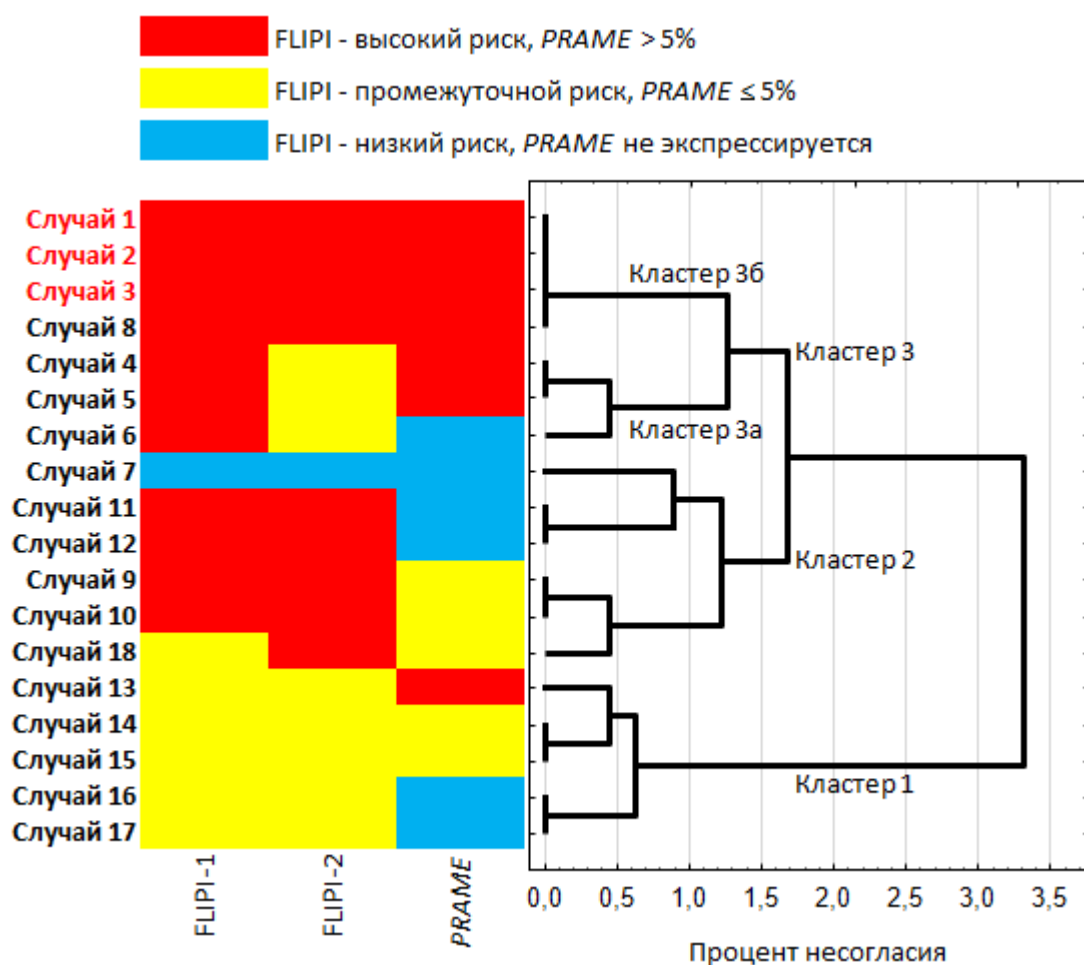
**Таблица 16** – Сопоставление признаков, значимых для определения групп риска по FLIPI-1 и FLIPI-2 у больных фолликулярной лимфомой, имеющих различный уровень экспрессии гена *PRAME* в лимфатических узлах

Признак	Значение в группе с высоким уровнем экспрессии <i>PRAME</i> в лимфатических узлах, n=7	Значение в группе с низким уровнем экспрессии <i>PRAME</i> в лимфатических узлах, n=11	Значение p, полученное после анализа при помощи различных критериев (Манна-Уитни*, критерий $\chi^{2**}$ )
Медиана возраста, лет, (диапазон)	61 (46–79)	59 (41–78)	0,8562*
Уровень гемоглобина (г/л), медиана (диапазон)	131 (121–137)	136 (82–172)	0,6833*
Больные с поражением более 4 зон лимфатических узлов, %	86	36	0,04**
Уровень ЛДГ, Ед/л, медиана (диапазон)	434 (254-842)	462 (394–1956)	0,2447*
Стадии заболевания III–IV, %	83	88	0,8489**

Признак	Значение в группе высоким уровнем экспрессии <i>PRAME</i> лимфатических узлах, n=7	Значение в группе низким уровнем экспрессии <i>PRAME</i> лимфатических узлах, n=11	Значение р, полученное после анализа при помощи различных критериев (Манна-Уитни*, критерий $\chi^2$ **)
Уровень $\beta$ 2-микроглобулина, %	83	75	0,7069**
Вовлечение костного мозга, %	71	55	0,4738**
Диаметр лимфатического узла (мм), медиана (диапазон)	47 (27–109)	56 (24–124)	0,4945*
Больные с низким риском по FLIPI-1, %	0	10	0,4117**
Больные с промежуточным риском по FLIPI-1, %	15	45	0,1715**
Больные с высоким риском по FLIPI-1, %	85	45	0,0876**
Больные с низким риском по FLIPI-2, %	0	10	0,4117**
Больные с промежуточным риском по FLIPI-2, %	57	45	0,6287**
Больные с высоким риском по FLIPI-2, %	43	45	0,9139**

Указанные группы больных не различались по признакам, включенным в данные прогностические индексы, кроме общего числа зон поражения. У больных из группы  $PRAME^{high}$  их количество было значимо выше по сравнению с больными из группы  $PRAME^{low}$  ( $p=0,04$ ). Различий по общему показателю индексов FLIPI не наблюдалось, кроме тенденции к значимости, наблюдаемой при определении числа больных, имеющих высокий риск по FLIPI-1 ( $p=0,0876$ ).

Кластерный анализ показал, что параметры FLIPI и значения уровня экспрессии  $PRAME$  выше или ниже 5% порога имеют несколько сочетаний (Рисунок 49). В кластер 1 были объединены больные, которые имеют промежуточный риск согласно FLIPI-1/FLIPI-2 и различный (от нулевого до очень высокого) уровень экспрессии  $PRAME$ . Кластер 2 – больные могут находиться в группе неблагоприятного риска по FLIPI-1/FLIPI-2, но иметь относительно низкий либо нулевой уровень экспрессии  $PRAME$ .



**Рисунок 49** – Кластерный анализ данных по значениям FLIPI и активности  $PRAME$ . Красным шрифтом выделены наблюдения с летальным исходом,  $n=3$

Кластер 3 разделяется на два подкластера. Кластер 3а – больные имеют неблагоприятный риск по FLIPI-1 или промежуточный риск по FLIPI-2, а также высокий (более 5%) уровень экспрессии *PRAME*, за исключением одного из случаев. В кластере 3б были больные, имеющие неблагоприятный риск по FLIPI-1/FLIPI-2 и высокий уровень экспрессии гена *PRAME*. Все больные, погибшие в период наблюдения, относились к кластеру 3б.

### 3.4.2. Т-клеточные лимфопролиферативные заболевания

Экспрессия *PRAME* обнаружена у 21 из 35 больных (60%). Медиана экспрессии гена *PRAME* составила 11,66% (0,42%–65,98%) в 9 из 20 образцов крови и 4,59% (0,45%-8,25%) в 6 из 23 образцов костного мозга больных Т-клеточными лимфопролиферативными заболеваниями (Т-кЛ). В 2 из 8 реактивных лимфатических узлов наблюдалась активность гена *PRAME* (на уровне 0,05% и 1,79%). В поражённых Т-кЛ лимфатических узлах больных активность *PRAME* выявлена в 12 из 14 образцов на уровне 5,83% (0,04%–75,8%), что было значимо больше по сравнению с реактивными образцами ( $p=0,0138$ ). В 3 случаях из 9 экспрессию *PRAME* обнаружили в образцах кожи, инфильтрированной трансформированными Т-клетками. Исследовалась также группа контроля. В образцах крови 12 здоровых добровольцев и костном мозге двух больных с негематологическими заболеваниями активность *PRAME* выявлена не была.

Уровень экспрессии *PRAME* не различался в зависимости от пола и возраста больных. При оценке уровня экспрессии *PRAME* у больных с различными стадиями установлено, что наибольшие значения отмечались при IV стадии заболевания согласно классификации Ann-Arbor ( $p=0,0734$ ).

Активность гена *PRAME* была зарегистрирована на разных уровнях при различных вариантах Т-кЛ. Например, активность гена *PRAME* у больных ПТЛН наблюдали на уровне 6,35% (0%–65,98%). Активность гена *PRAME* при АИТЛ, грибовидном микозе и анапластической Т-крупноклеточной, ALK+ лимфоме была ниже и составила 0% (0%–0,13%), 0,45% (0%–0,96%), и 5,83% (0%–15,39%) соответственно. Другие заболевания в данном сравнении не приведены в силу небольшого числа наблюдений.

У 4 из 8 больных с гистологически доказанным вовлечением костного мозга выявлялась экспрессия *PRAME*. При отсутствии гистологически доказанного поражения костного мозга Т-кЛ экспрессия *PRAME* в нем не детектировалась. Таким образом, активность *PRAME* в костном мозге была ассоциирована с поражением, подтвержденным с помощью гистологического исследования ( $p=0,0289$ ).

У 8 больных заболевание протекало с лейкоцитозом за счет диссеминации опухоли, у 7 больных – без признаков лейкоцитоза. В 6/8 случаев с лейкоцитозом экспрессировался ген *PRAME* в периферической крови. В одном из 7 случаев без лейкоцитоза также отмечена экспрессия *PRAME* в периферической крови. У данного больного выявлена экспрессия *PRAME* и в лимфатическом узле. Таким образом, экспрессия *PRAME* в крови больных Т-клеточными лимфомами связана с наличием минимальной диссеминированной болезни и может являться дополнительным молекулярным маркером наличия опухолевых клеток в биологическом материале ( $p=0,0187$ ).

Интересно отметить, что все больные, имеющие активный *PRAME* в костном мозге при гистологически доказанном его поражении или в крови с доказанной минимальной диссеминированной болезнью, одновременно имели экспрессию *PRAME* и в лимфатических узлах, поражённых опухолью. При этом больные, у которых *PRAME* не экспрессировался в лимфатических узлах, ни в одном случае не имели его экспрессию в костном мозге. Экспрессия не наблюдалась и в случаях гистологически доказанного поражения костного мозга.

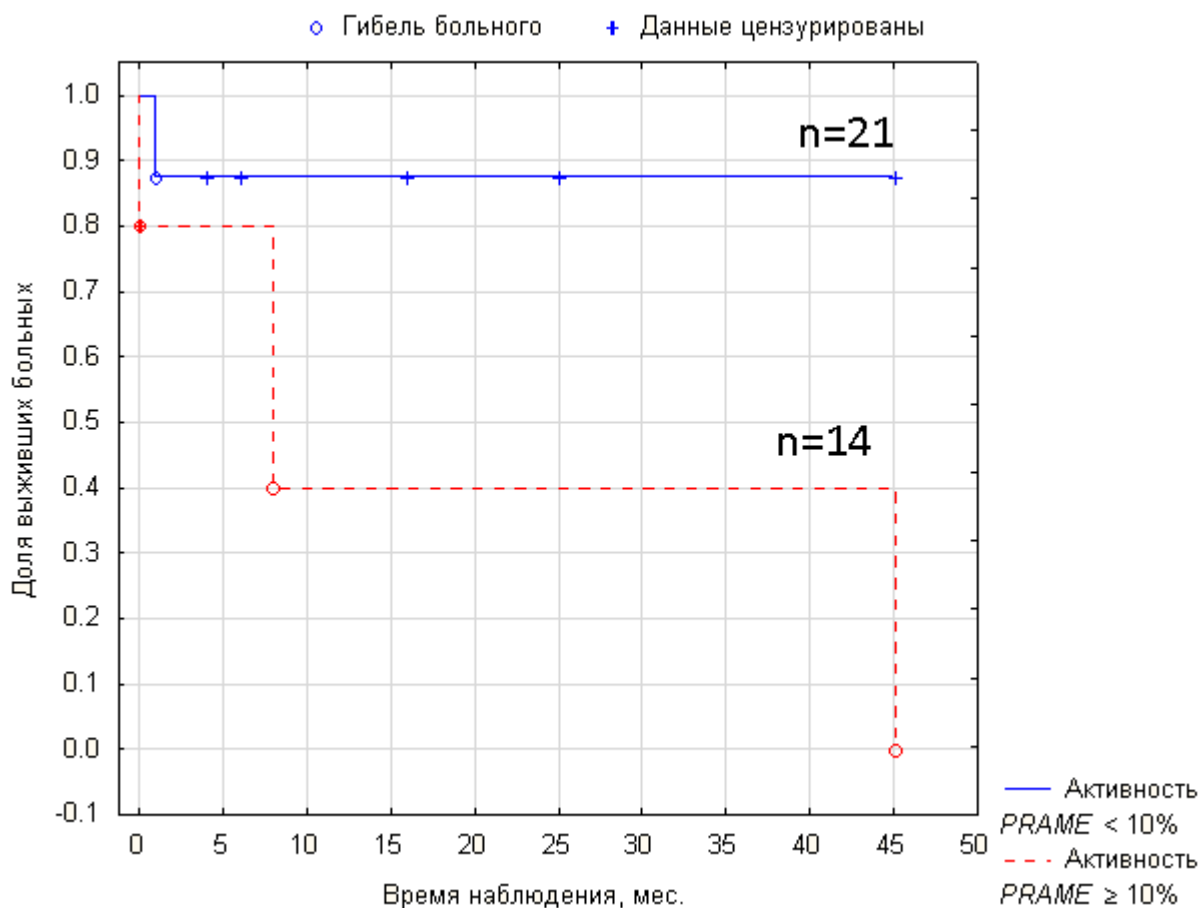
Мы оценили связь активности *PRAME* в лимфатических узлах больных с индексом пролиферативной активности Ki-67 опухолевых клеток. Построение модели линейной регрессии показало прямую зависимость между уровнями экспрессии *PRAME* и Ki-67 ( $R^2=0,5399$ ,  $p=0,0155$ ).

Связь активности *PRAME* с другими показателями, такими как активность ЛДГ, иммунофенотип трансформированных Т-клеток не была обнаружена.

При сопоставлении активности *PRAME* с параметрами выживаемости установлено, что больные, у которых экспрессия данного гена выявлена в любом

биологическом материале, имели несколько худшие показатели ОВ и БСВ по сравнению с *PRAME*-негативными больными, однако результаты статистически не значимы ( $p=0,941$  и  $p=0,8566$  соответственно). При выборе различных пороговых значений (cut-off) экспрессии *PRAME* параметры выживаемости были хуже у больных, имеющих больший уровень экспрессии *PRAME*. Однако статистически значимых различий не выявлено.

При оценке связи экспрессии *PRAME* в лимфатических узлах с параметрами выживаемости больных Т-кЛ установлено, что экспрессия *PRAME* на уровне выше 10 относительно *ABL* связана с более низкими значениями ОВ ( $p=0,0787$ , Рисунок 50). БСВ при данном пороговом уровне экспрессии *PRAME* не различалась ( $p=0,7185$ , Таблица 17).



**Рисунок 50** – Общая выживаемость больных ФЛ с различным уровнем экспрессии гена *PRAME* в лимфатических узлах

**Таблица 17** – Параметры выживаемости больных в зависимости от экспрессии гена *PRAME* в лимфатических узлах

Группирующий признак	2-летняя ОВ, име- ющих при- знак, %	2-летняя ОВ, не име- ющих при- знак, %	р	2-летняя БСВ, име- ющих при- знак, %	2-летняя БСВ, не име- ющих при- знак, %	р
Экспрессия <i>PRAME</i> в любом материале >10% (n=35)	73	77	0,941	62	76	0,301
Экспрессия <i>PRAME</i> в лимфатическом узле >10% (n=14)	40	87	0,0787	80	63	0,7185
Пациенты с трансплантацией костного мозга (n=9)	100	65	0,0897	87	63	0,1262
Проведение трансплантации (только <i>PRAME</i> -позитивные больные) (n=20)	100	66	0,2305	83	76	0,697
Проведение трансплантации (только <i>PRAME</i> -негативные больные) (n=12)	100	63	0,2661	100	51	0,0452



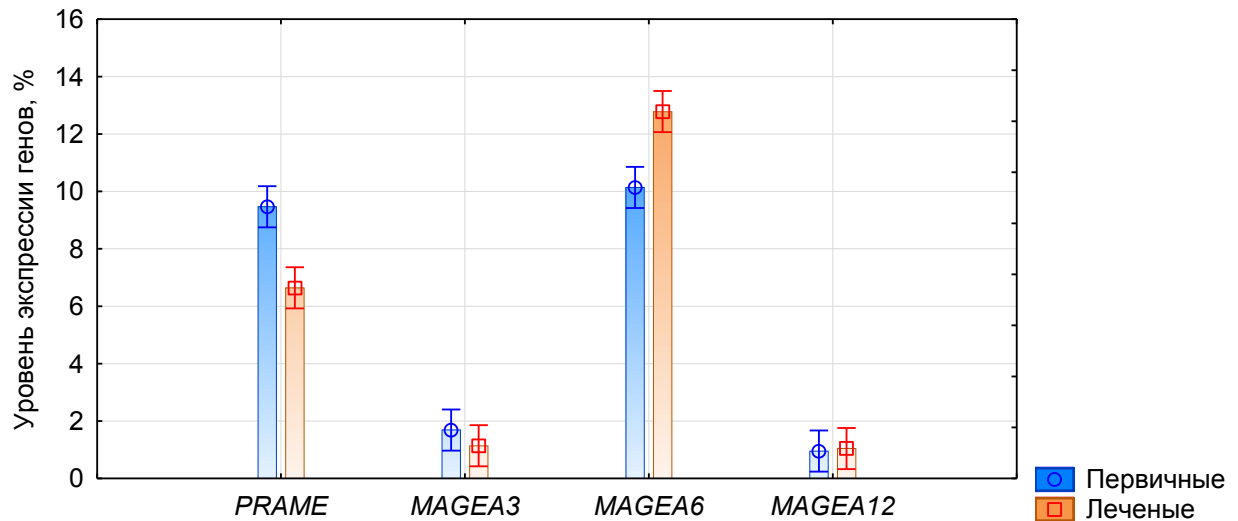
Части больных (n=9) была выполнена трансплантация ГСК (аллогенная или аутологичная). В общей группе пациентов показатели общей выживаемости имели тенденцию к статистической значимости в отношении улучшения прогноза заболевания больных Т-кЛ, которым была проведена трансплантация ГСК в сравнении с пациентами без трансплантации; в отношении БСВ статистической значимости получено не было ( $p=0,0897$  и  $p=0,1262$  соответственно).

У больных Т-кЛ, прошедших трансплантацию ГСК, у которых экспрессия *PRAME* в биологических образцах не детектировалась, ОВ была несколько выше, чем у больных той же группы, но без выполнения трансплантации ГСК ( $p=0,2661$ ), однако различия не достигли статистической значимости. При этом показатели БСВ после трансплантации ГСК оказались значимо лучше, чем без трансплантации в той же группе больных ( $p=0,0452$ ).

У больных Т-кЛ, в биологических образцах которых выявлялась экспрессия *PRAME*, не выявлено значимых различий между группами с и без проведения трансплантации ГСК в отношении показателей ОВ и БСВ ( $p=0,2305$  и  $p=0,697$ , соответственно).

### 3.4.3. Множественная миелома

В клетках костного мозга больных ММ была определена экспрессия генов *PRAME*, *MAGEA3*, *MAGEA6* и *MAGEA12*. Поскольку мы обладали данными о коэкспрессии *PRAME* и генов группы *MAGE*, мы сравнили между собой экспрессию РТГ у больных до и после проведения лечения. Уровень экспрессии *PRAME* у больных ММ до лечения был выше, чем у прошедших лечение (Рисунок 51). В качестве протоколов лечения были выбраны VCP или VMP. Медиана срока наблюдения за данными больными составила 11 мес. Уровень экспрессии гена *PRAME* не повлиял на параметры ОВ и БСВ у больных ММ ( $p>0,8$  для обоих случаев, графики не представлены). Уровень экспрессии гена *MAGEA3* также оказался не связан с параметрами выживаемости больных ( $p>0,6$  для ОВ и БСВ, графики не представлены). Напротив, активность генов *MAGEA6* и *MAGEA12* оказалась значимо связана с ухудшением параметров ОВ и БСВ ( $p>0,5$ , графики не представлены).



**Рисунок 51** – активность гена *PRAME* и генов группы *MAGE* у первичных и леченых больных ММ

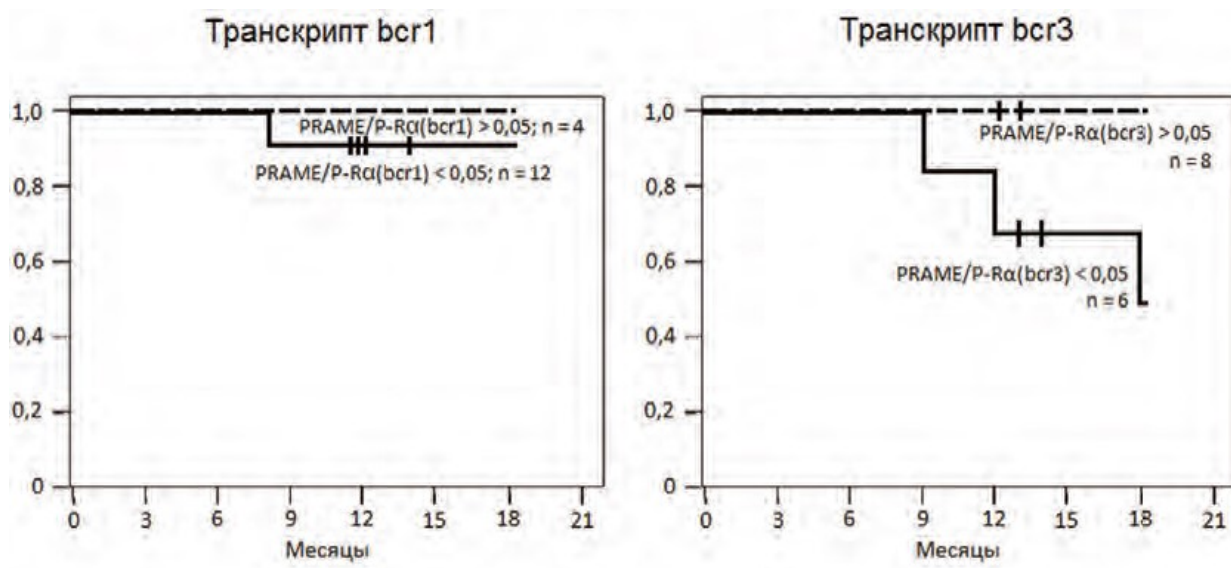
#### 3.4.4. Коэкспрессия генов *PRAME* и *PML-RAR $\alpha$* и риск развития рецидива острого промиелоцитарного лейкоза

Срок наблюдения за больными ОПЛ составил 18 месяцев. Установлено, что пациенты, имеющие хромосомную перестройку в точке *bcr1*, достигали клинической и молекулярной ремиссии в среднем на 39 день от начала терапии по протоколу AIDA (полностью-трансретиноевая кислота, идарубицин). При экспрессии изоформы *bcr3* химерного гена констатация клинической и молекулярной ремиссии происходила в среднем через 41 день с момента начала терапии.

Для удобства работы с данными об уровнях экспрессии мРНК гена *PRAME* и транскриптов гена *PML-RAR $\alpha$*  мы разделили первую величину на вторую. Таким образом, для каждого пациента было рассчитано уникальное соотношение уровней экспрессии этих двух генов. В качестве пограничного значения мы выбрали уровень соотношения, равный 0,05, и разделили всех пациентов на четыре субгруппы.

Мы сравнили это соотношение со временем развития рецидива заболевания (Рисунок 52). Наибольшую частоту развития рецидивов наблюдали у пациентов, экспрессирующих изотип *bcr3* гена *PML-RAR $\alpha$*  и значением соотношения уровня экспрессии гена *PRAME* к гену *PML-RAR $\alpha$* , находящееся ниже 0,05. В этой группе

из 6 человек у половины развился рецидив. Что же касается пациентов, изначально имеющих хромосомную перестройку в точке *bcr1*, то среди них наблюдался всего один случай рецидива. У этого пациента из группы *PML-RAR $\alpha$  bcr1* – позитивных отношение уровня экспрессии гена *PRAME* к химерному гену было ниже отметки 0,05.

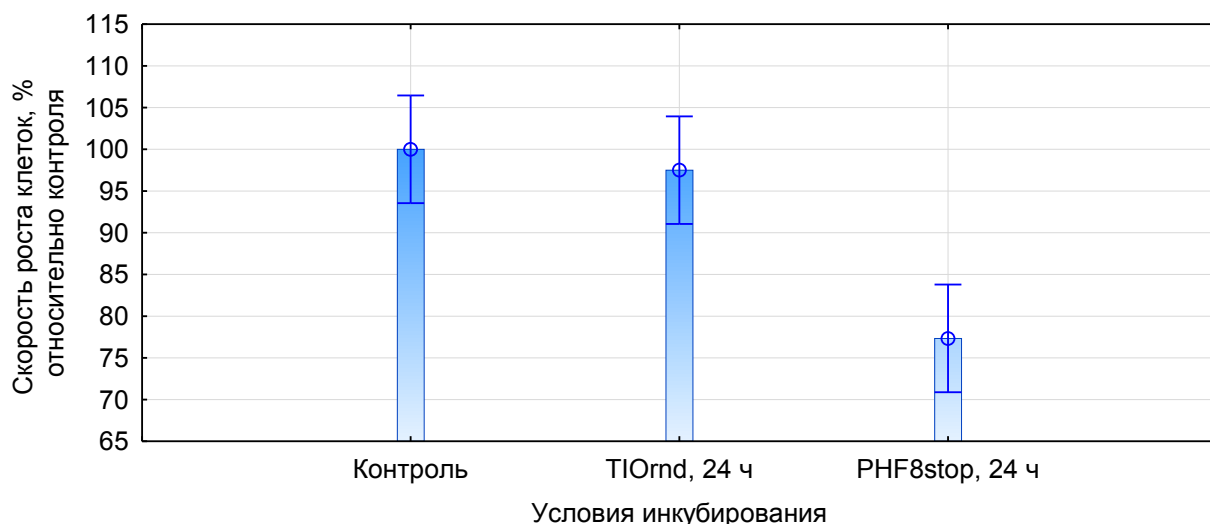


**Рисунок 52** – время развития рецидива ОПЛ от уровня экспрессии *PRAME*

### 3.5. Разработка подходов к таргетной терапии *PRAME*-экспрессирующих опухолей

#### 3.5.1. Результаты блокирования экспрессии гена *PHF8* в клетках меланомы A875

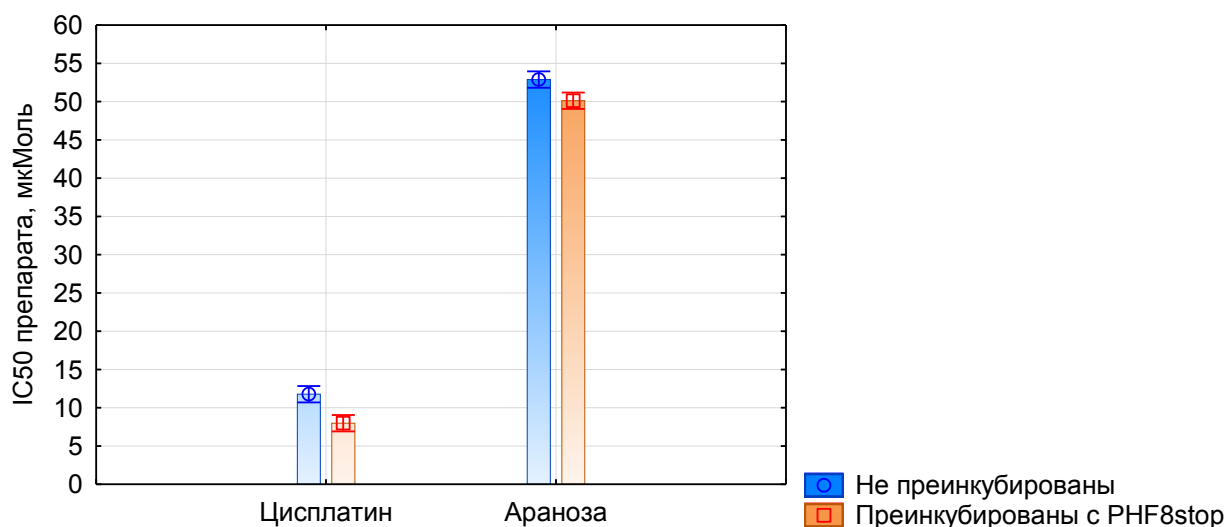
Специфическое тиопроизводное PHF8stop в концентрации 1,25 нМ, инкубирование с клетками A875 в течение 24 часов, статистически значимо снижало ( $p=0,008$ ) скорость пролиферации данных клеток по сравнению с контролем без тиопроизводного и добавлением тиопроизводного TIOnd, имеющего случайную последовательность (Рисунок 53).



**Рисунок 53** – скорость пролиферации клеток A875 в условиях коинкубирования с PHF8stop

Были проведены исследования по длительному инкубированию клеток A875 с PHF8stop. Культуральную среду меняли каждые три дня, добавляя в неё PHF8stop до конечной концентрации 1,25 нМ. Через 12 суток клетки полностью погибли.

Преинкубирование в течение суток с 1,25 нМ PHF8stop увеличивало чувствительность клеток A875 к цисплатину (Рисунок 54). Так, IC50 цисплатина при инкубации с клетками A875 в течение 3 суток составляет 12,14 мкМоль. В случае, когда клетки были преинкубированы с PHF8stop, IC50 цисплатина составила 8,09 мкМоль ( $p=0,0031$ ).



**Рисунок 54** – чувствительность клеток A875 к цисплатину и аранозе

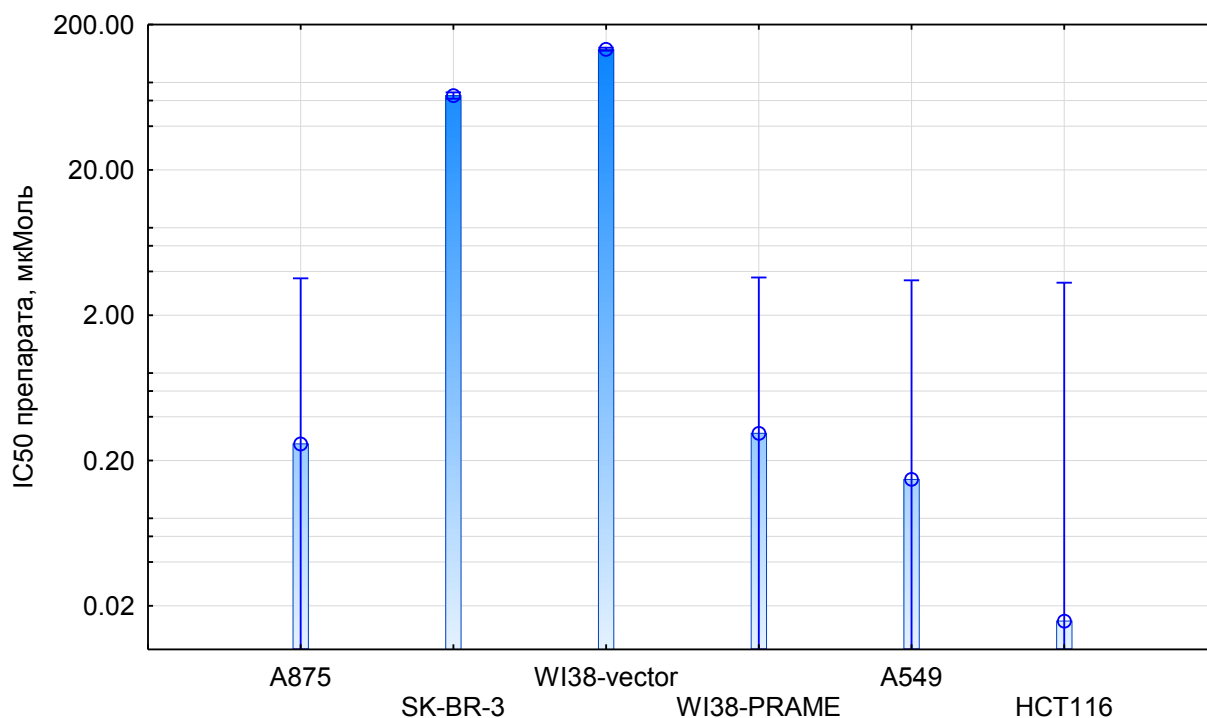
Чувствительность к аранозе статистически значимо не изменилась: исходное значение IC50 составляет 51,34 мкМоль, в то время как для преинкубированных клеток она составляет 50,98 мкМоль ( $p=0,98$ , Рисунок 54).

### **3.5.2. Исследование синергизма бортезомиба и других химиопрепаратов на PRAME-экспрессирующих линиях**

Первоначально оценивали чувствительность клеточных линий, различающихся как по происхождению, так и по уровню экспрессии *PRAME*. Линия A875 – это клетки меланомы, обладающие значительным (от 5834% относительно гена *ABL*) уровнем экспрессии гена *PRAME*. Линия SK-BR-3 выведена из клеток рака молочной железы, и имеет относительно высокий уровень экспрессии *PRAME* – 149% относительно гена *ABL*. Линия клеток рака лёгких A549 имеет относительно средний уровень экспрессии *PRAME* – от 36% относительно гена *ABL*. Наконец, в клетках линии колоректального рака HCT-116 также наблюдался низкий уровень экспрессии *PRAME*, составивший 1,4%. Для сравнения использовались также полученные ранее линии клеток WI-38 (уровень экспрессии *PRAME* 0,002%) и WI-38-*PRAME* (уровень экспрессии *PRAME* от 5471%).

Согласно результатам МТТ, проведённому через трое суток после инкубации с бортезомибом, клеточные линии обладают разной чувствительностью к данному препарату (Рисунок 55). Чувствительности клеток WI-38 к бортезомибу была ниже по сравнению с линией WI-38-*PRAME*.

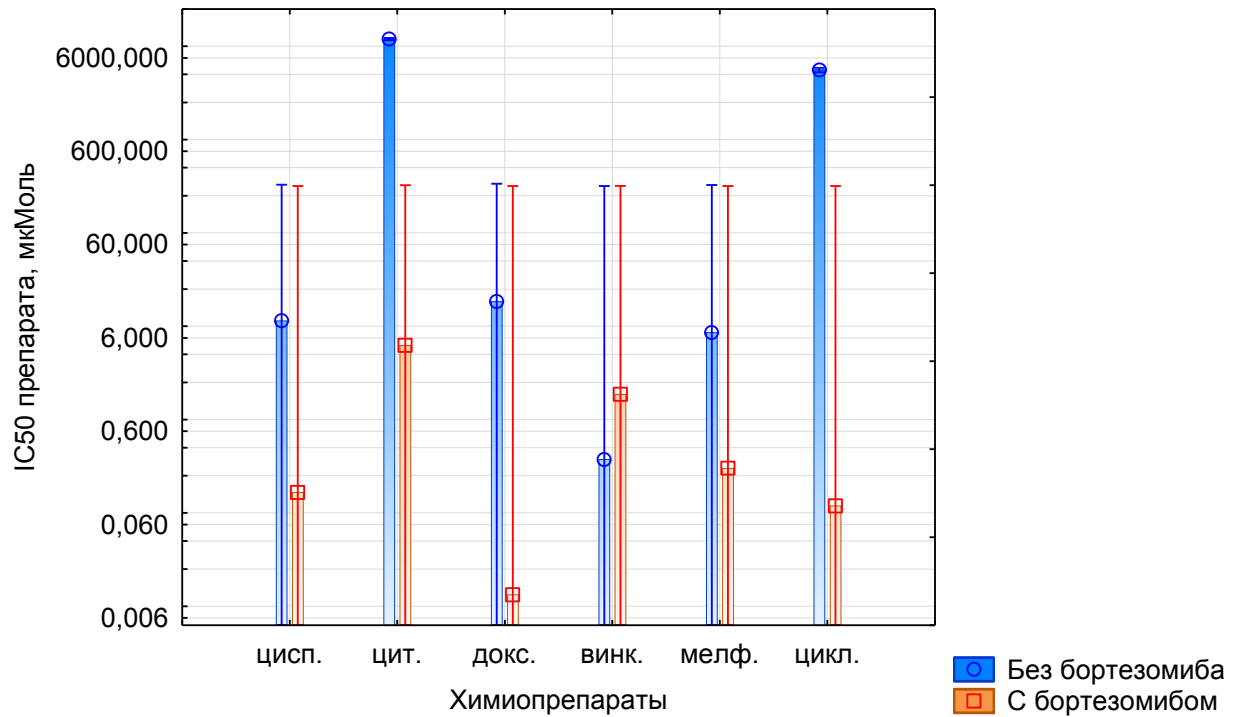
Как следует из полученных данных, чувствительность клеток к бортезомибу не коррелирует с экспрессией в них белка *PRAME*. Из этого следует, то успех применения бортезомиба у *PRAME*-гиперэкспрессирующих больных множественной миеломой объясняется другими факторами. Возможно, имеют значение другие химиопрепараты, воздействие которых на опухолевые клетки усиливалось при помощи бортезомиба.



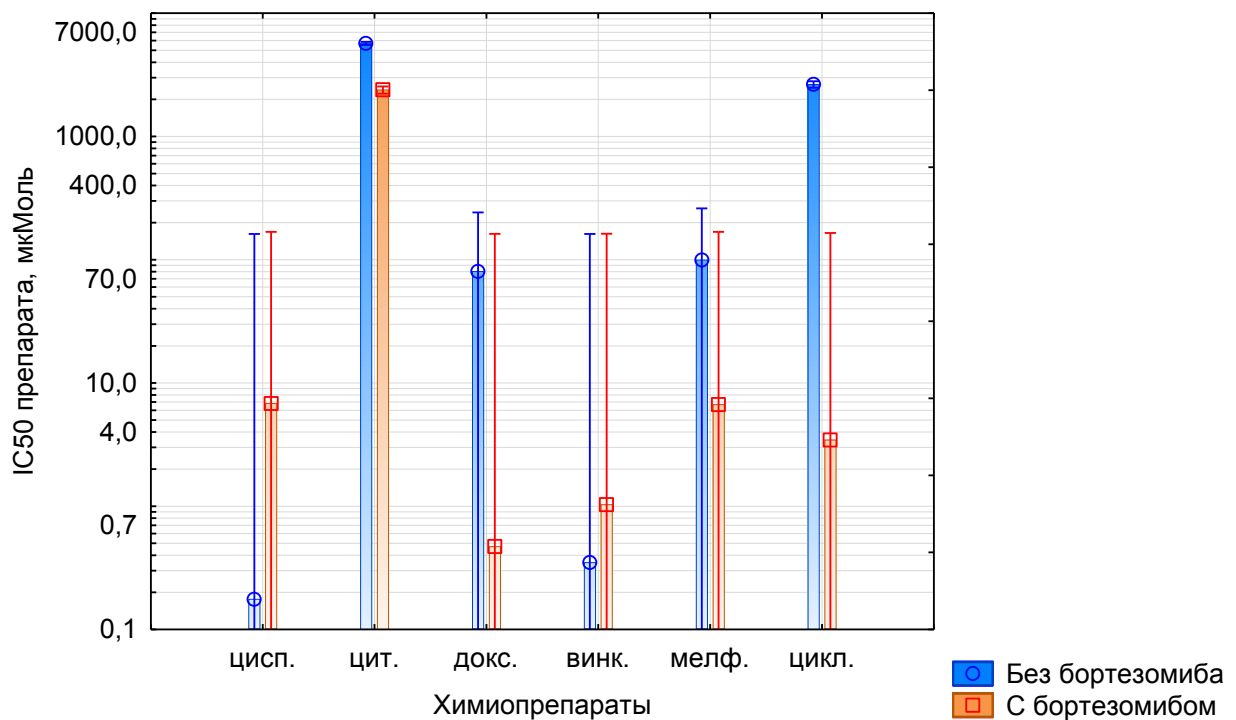
**Рисунок 55** – IC50 бортезомиба для клеточных линий различного происхождения. Инкубирование в течение трёх суток

На следующем этапе изучали синергизм цитотоксического воздействия бортезомиба с одним из противоопухолевых цитостатиков (цисплатином, цитарабином, доксорубицином, винкристином, мелфаланом и циклофосфамидом). В данных комбинациях бортезомиб использовался в концентрациях, равных уровню IC10. Такие концентрации бортезомиба позволяли сохранить большее количество клеток. В результате это не мешало наблюдению за параметрами цитотоксичности других химиопрепаратов.

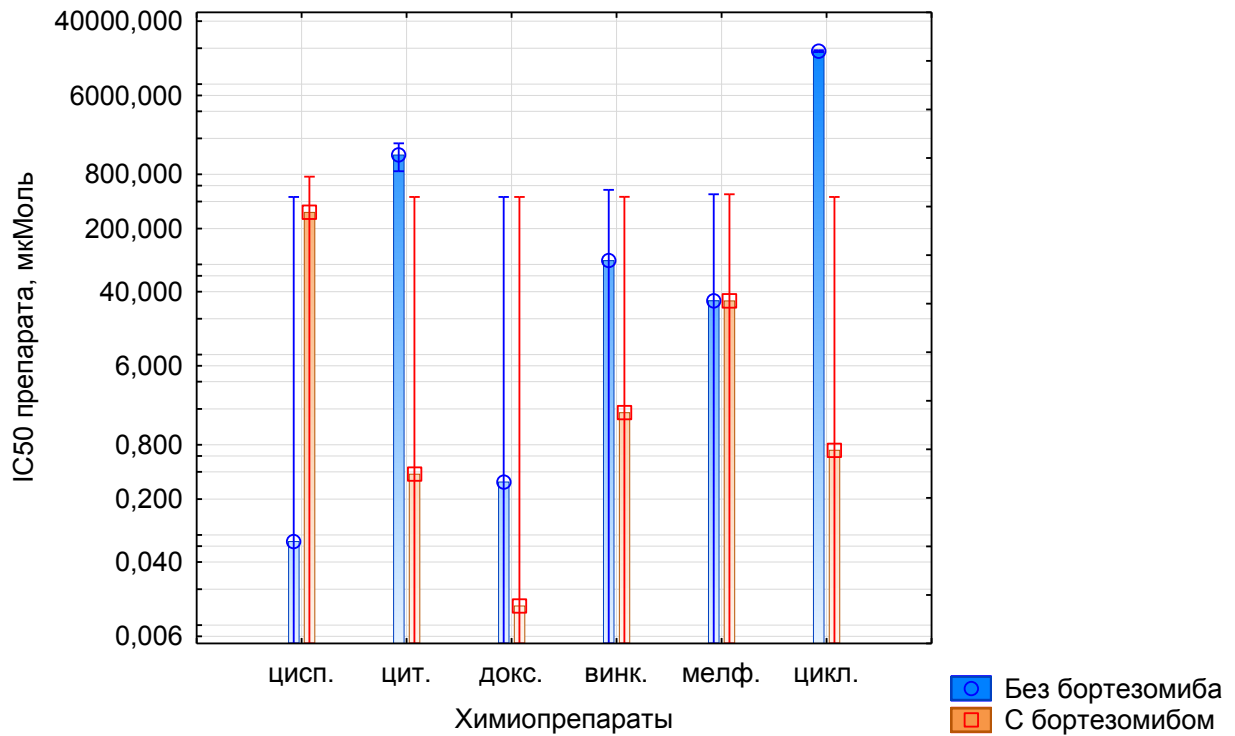
Результаты МТТ показали, что чувствительность *PRAME*-позитивных клеточных линий к химиопрепаратам в большинстве случаев различается в зависимости от наличия в среде бортезомиба (Рисунки 56–61). Исключением оказался винкристин, который ни в одном эксперименте не обладал синергизмом с бортезомибом.



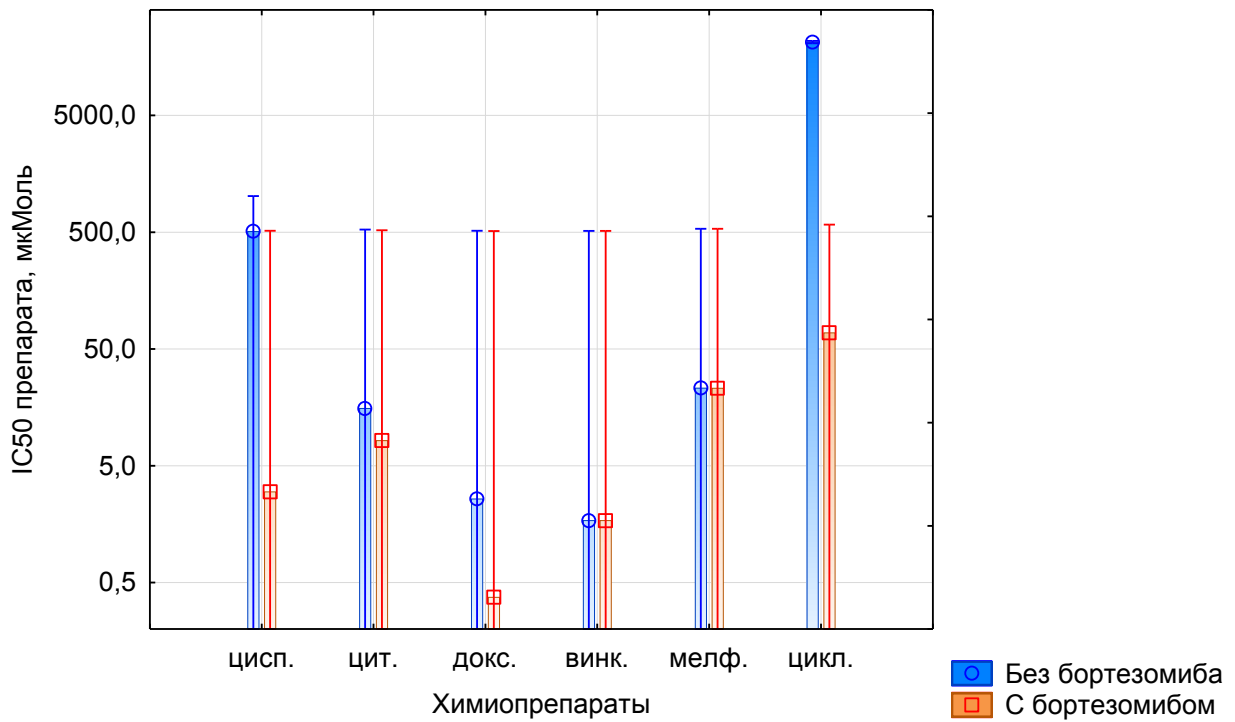
**Рисунок 56** – исследование синергизма бортезомиба и других химиопрепаратов на линии A875



**Рисунок 57** – исследование синергизма бортезомиба и других химиопрепаратов на линии SK-BR-3

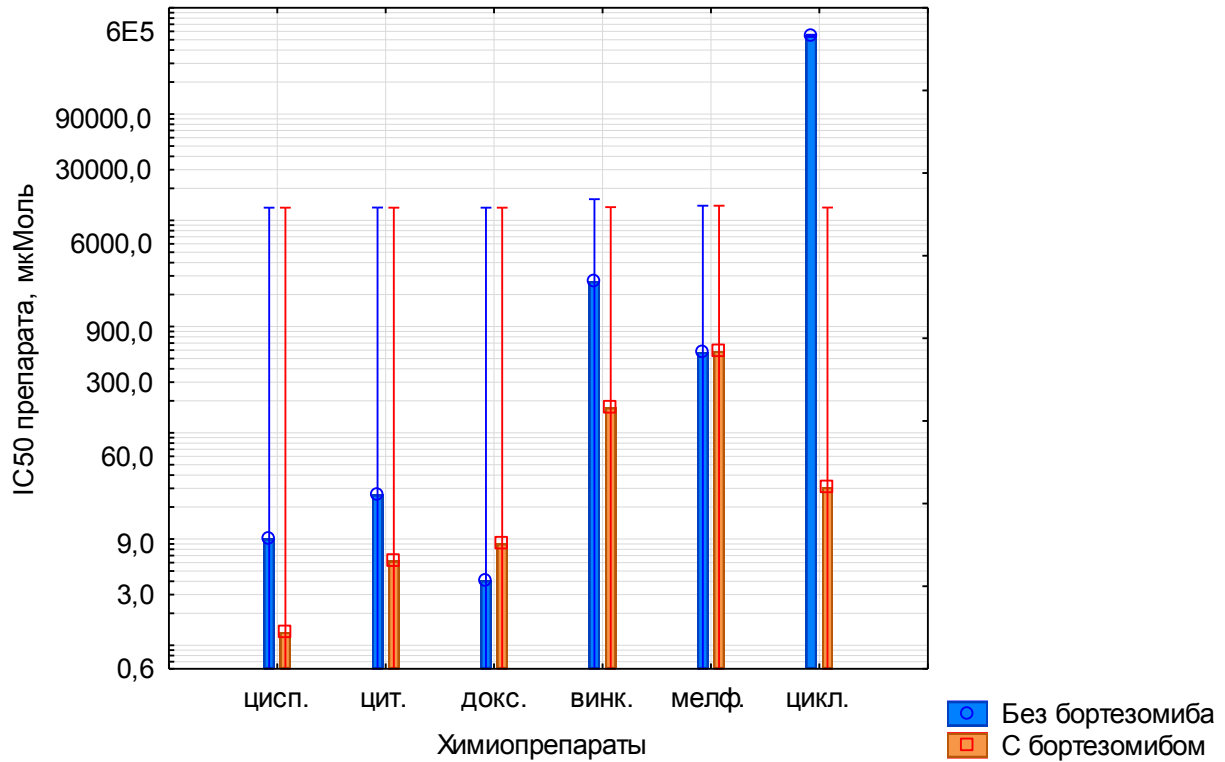


**Рисунок 58** – исследование синергизма бортезомиба и других химиопрепаратов на линии WI-38-vector

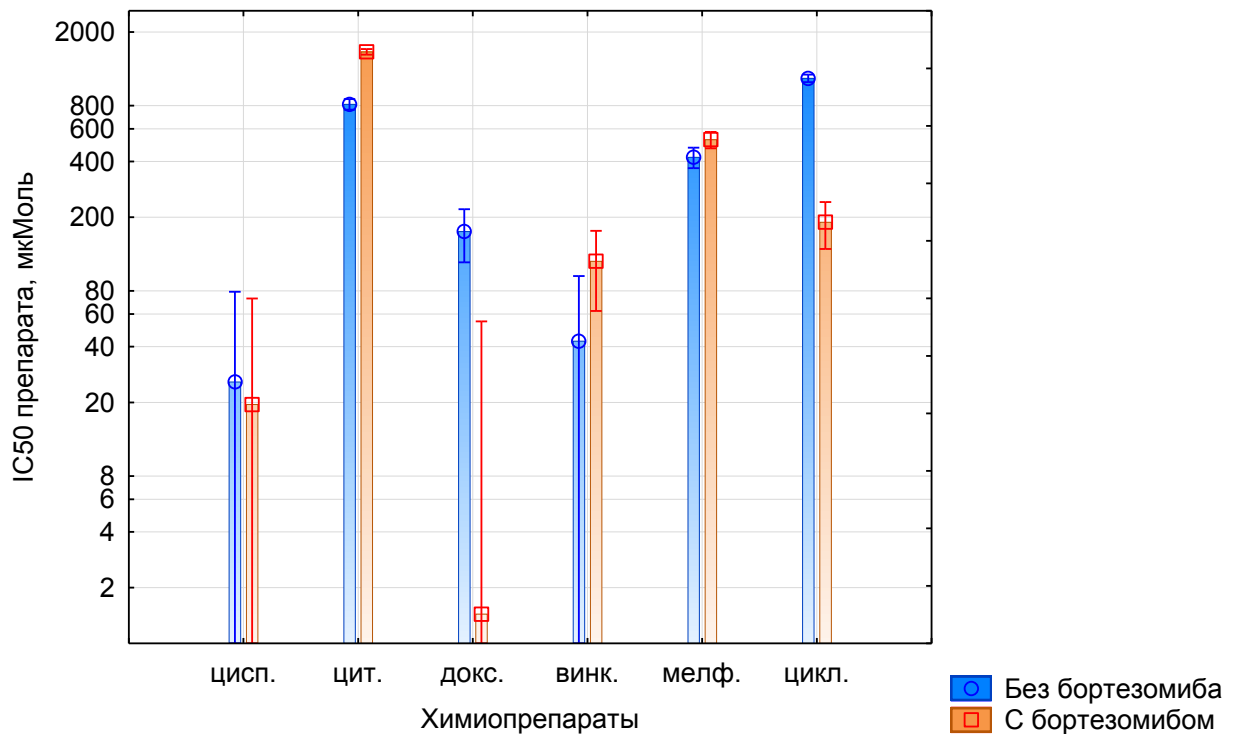


**Рисунок 59** – исследование синергизма бортезомиба и других химиопрепаратов на линии WI-38-PRAME





**Рисунок 60** – исследование синергизма бортезомиба и других химиопрепаратов на линии A549



**Рисунок 61** – исследование синергизма бортезомиба и других химиопрепаратов на линии HCT-116

Мы рассчитали комбинаторный индекс для бортезомиба и перечисленных химиопрепаратов для всех исследованных линий (Таблица 18). Чем большим уровнем экспрессии гена *PRAME* обладали линии, тем чаще наблюдался значительный синергизм цитотоксического воздействия бортезомиба и химиопрепаратов на эту линию. Как в случае опухолевых линий, бортезомиб усиливал цитотоксическое воздействие химиопрепаратов на клетки WI-38-PRAME.

Для бортезомиба и других химиопрепаратов рассчитали значения комбинаторного индекса (Таблица 18). Показатель в диапазоне от 0,2 до 0,4 соответствует значительному синергизму, 0,4–0,6 – синергизму, 0,6–0,8 – умеренному синергизму, 0,8–0,9 – незначительному синергизму, 0,9–1,1 – аддитивному эффекту, 1,1–1,3 – умеренному антагонизму, и в случае превышения 1,3 – антагонизму. На *PRAME*-негативной клеточной линии WI-38 наблюдался антагонизм действия бортезомиба и химиопрепаратов. На *PRAME*-гиперэкспрессирующих линиях опухолей A875 и SKBR-3 все препараты, кроме винкристина, обладали синергизмом с бортезомибом. На клеточной линии WI-38-PRAME также наблюдался синергизм цитарабин, доксорубицина, мелфалана и циклофосфамида с бортезомибом.

Линии были кластеризованы на основании значений комбинаторного индекса (Рисунок 62). Распределение было таким, что в одном кластере оказались линии A875, SKBR-3 и WI-38-PRAME, экспрессирующие *PRAME* на высоком уровне. В другой кластер вошли линии A549 и HCT-116, обладающие относительно небольшим уровнем экспрессии *PRAME*. Клетки WI-38 не вошли ни в один из кластеров. Таким образом, величина экспрессии *PRAME* оказалась связана с разной чувствительностью клеточных линий к комбинации химиопрепаратов с бортезомибом.

**Таблица 18** – Расчёт комбинаторного индекса для бортезомиба и других химиопрепаратов

Химиопрепараты	Исследованные линии клеток					
	A875	SK-BR-3	A549	HCT-116	WI-38-vector	WI-38-PRAME
Цисплатин	0,22	0,70	0,15	2,17	74,69	4,30
Цитарабин	0,20	0,01	0,25	2,53	51,29	0,01
Доксорубицин	0,89	0,02	2,28	1,75	53,49	0,07
Винкристин	6,16	2,77	0,96	3,45	52,36	1,09
Мелфалан	0,62	0,08	1,05	3,06	251,80	0,12
Циклофосфамид	0,20	0,01	1,36	2,78	51,28	0,01

Таким образом, бортезомиб позволил увеличить чувствительность опухолевых линий к таким химиопрепаратам, как цисплатин, цитарабин, доксорубицин, мелфалан и циклофосфамид. Однако чувствительность этих клеток к винкристину не изменилась после добавления бортезомиба.

Чувствительность к химиопрепаратам увеличивалась тем сильнее, чем больший уровень экспрессии гена *PRAME* наблюдался в клеточной линии. При этом чувствительность неопухолевых клеток WI-38 с очень низким уровнем экспрессии *PRAME* к химиопрепаратам практически не изменилась.

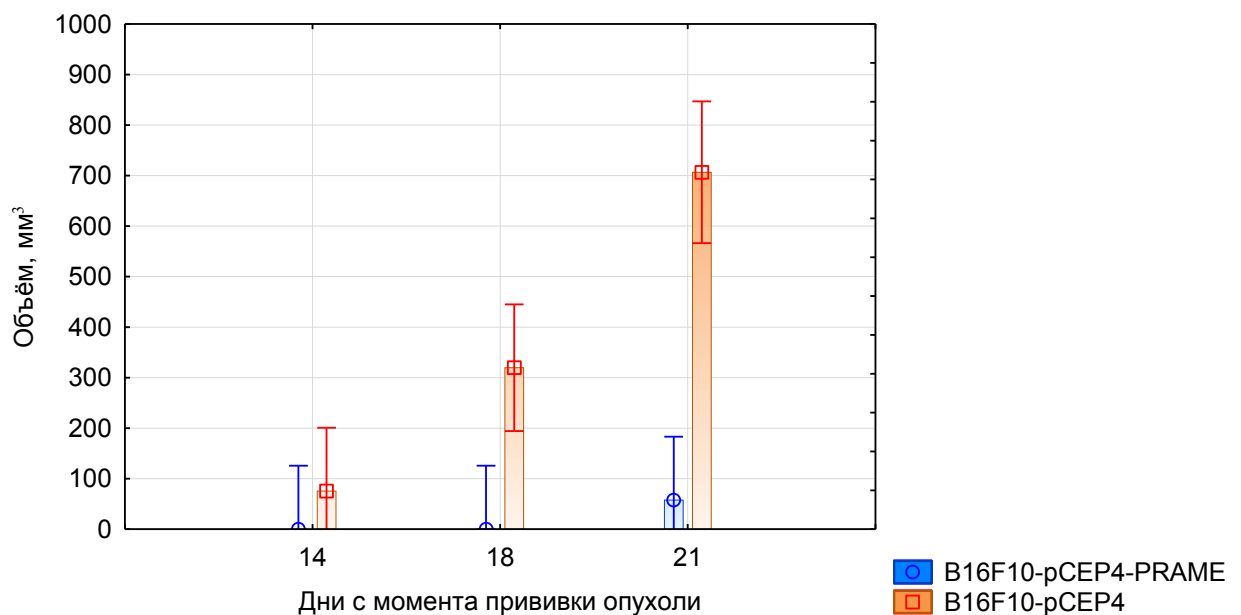


полученной из клеток линии B16F10-pCER4-PRAME, статистически значимо выше ( $p=0,0006$ ), чем скорость роста линии B16F10-pCER4 (Рисунок 63).

**Таблица 19** – влияние анти-PRAME антител на рост опухоли B16F10-pCER4-PRAME у мышей

Вариант опыта	(COO) (мм <sup>3</sup> ) через			Доля мышей с опухолью (%) через			Доля ПМ через 21 сут
	14 сут	18 сут	21 сут	14 сут	18 сут	21 сут	
Контроль	75,5	320	707	80	100	100	20
Иньекции 4G1-D2	7,2 (90)	129 (60)	448 (37)	40	80	100	40
Иньекции 5D3	0 (100)	35 (89)	238 (66)	0	100	100	0
Иньекции 6H8	0 (100)	7,6 (98)	137 (81)	0	100	100	0

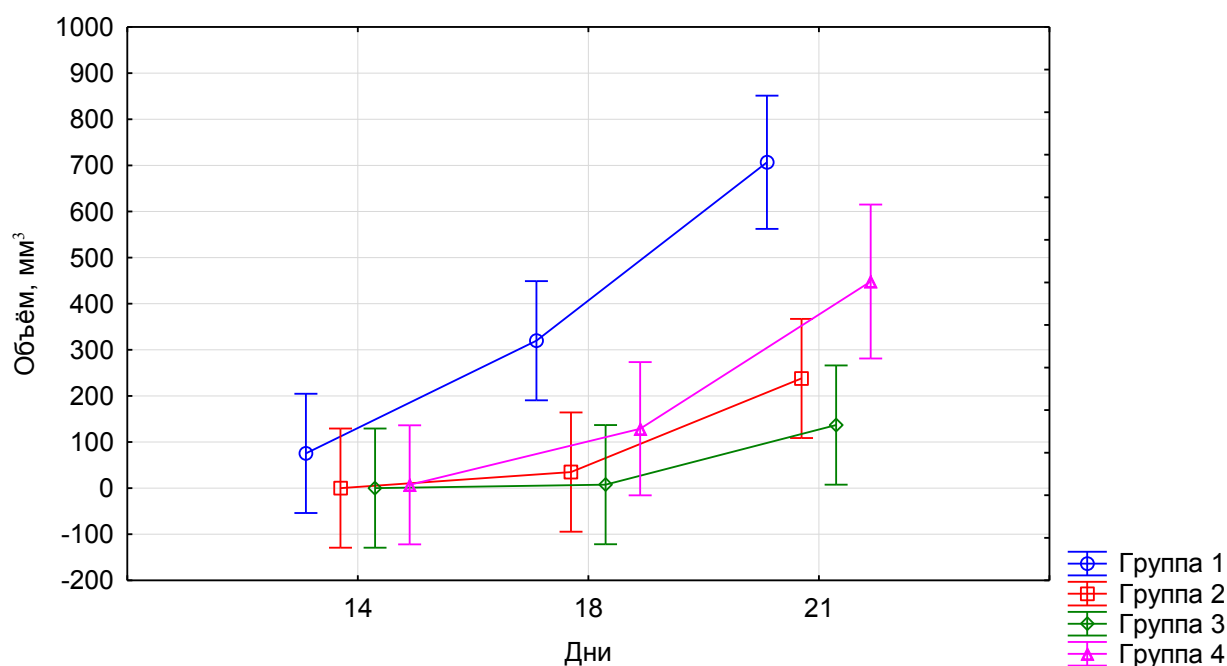
Примечание: COO – средний объём опухоли. В графах для «COO» в скобках указаны значения ТРО. ПМ – павшие мыши



**Рисунок 63** – Сравнение скорости роста B16F10-pCER4-PRAME и B16F10-pCER4

Мы установили, что скорость роста клеток линии B16F10-pCER4 не зависит от того, какой антиген распознавали введённые антитела ( $p=0,164$ ).

Опухоль B16F10-pCER4-PRAME реагировала на введение мышам антител 5D3 и 6H8, распознающих антиген PRAME (Рисунок 64). Наименьшую скорость роста по сравнению с контролем без применения антител наблюдали при введении мышам антитела 6H8 ( $p=0,0028$ ), и несколько большую – при введении антител 5D3 ( $p=0,0397$ ). Скорость роста опухоли B16F10-pCER4-PRAME у мышей, получивших контрольное анти-GAGE антитело 4G1-D2, была статистически незначимо меньшей по сравнению с контролем ( $p=0,5762$ ).



**Рисунок 64** – Торможение скорости роста опухоли B16F10-pCER4-PRAME *in vivo* в условиях введения антител. 1 – без антител, 2 – антитело 5D3, 3 – антитело 6H8, 4 – антитело 4G1-D2

Были проведены эксперименты по введению антител мышам Balb/c Nu/Nu с привитой опухолью mel P, экспрессирующей PRAME человека на высоком уровне. В экспериментах использовали химерное антитело 6H8chim, разработанное на базе мышинового антитела 6H8 и предоставленное институтом Биоорганической химии им. Шемякина и Овчинникова (Москва).

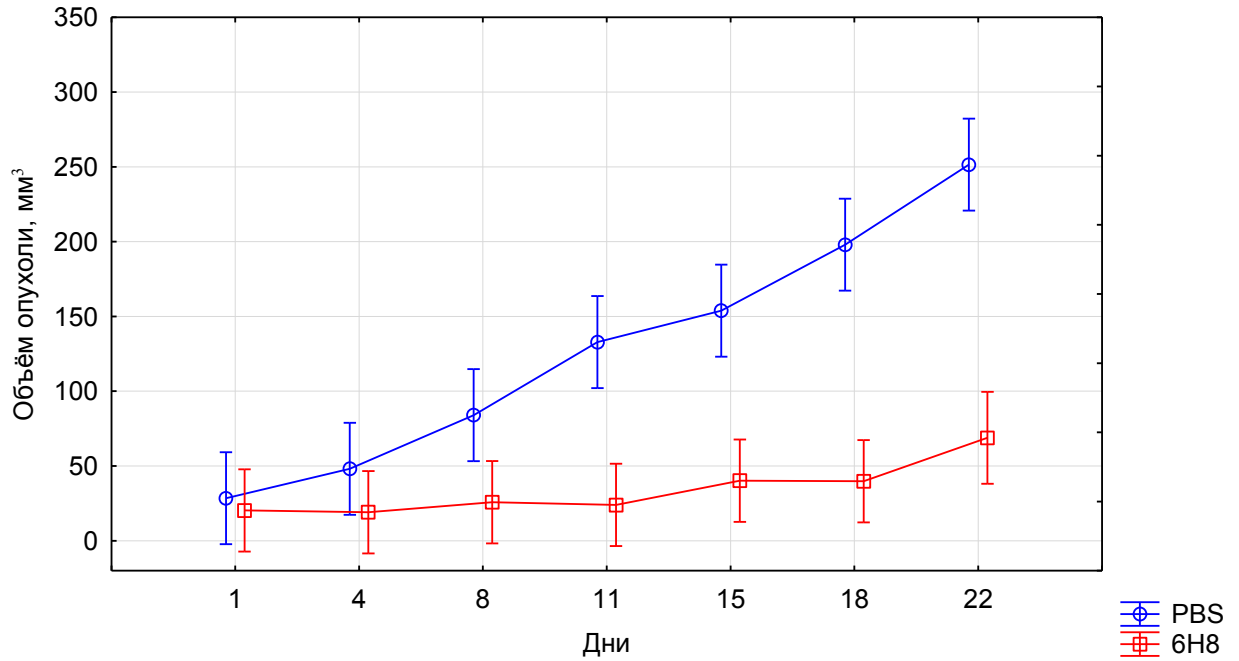
Проводили сравнение скорости роста опухоли в каждой из экспериментальных групп по сравнению с контрольной группой мышей,

получивших PBS или контрольное CD20-распознающее антитело ритуксимаб (Таблица 20). Во всех случаях отмечалось статистически значимое ТРО по сравнению с группой мышей, получивших PBS ( $p < 0,0001$ , Рисунки 65 и 66). ТРО у мышей, получивших мышинные и химерные антитела 6H8, различалась статистически незначимо ( $p = 0,8085$ , Рисунок 67).

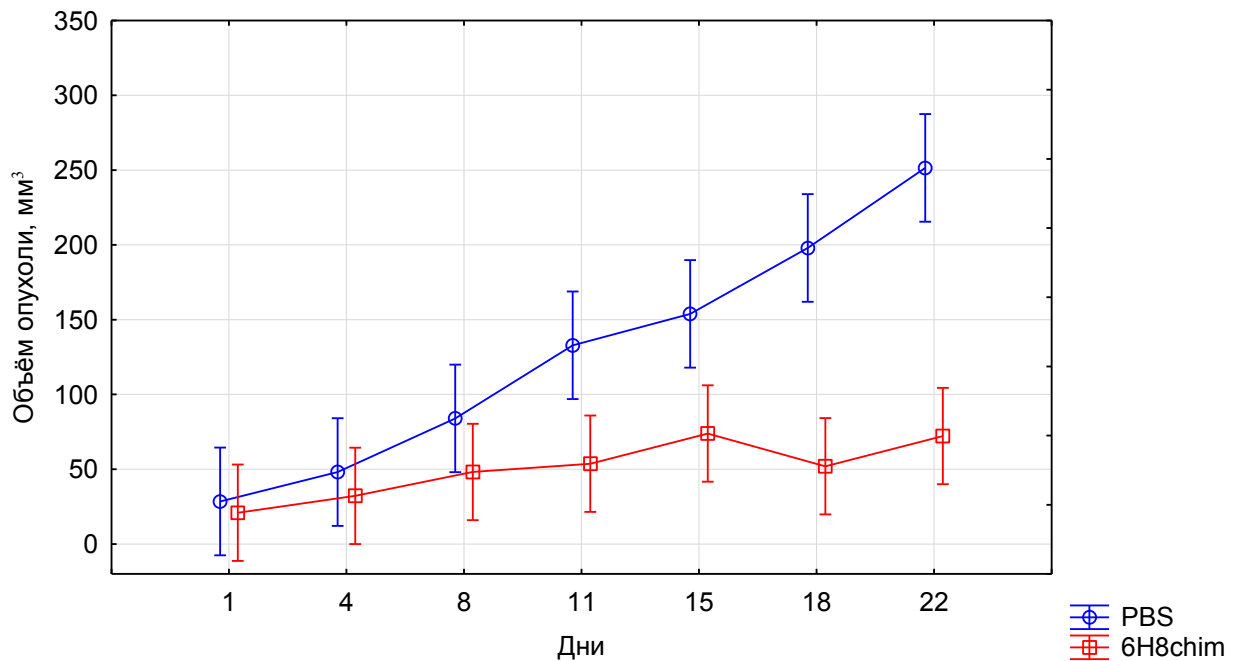
Таким образом, при введении анти-PRAME антител достигалось торможение скорости роста PRAME-позитивной опухоли не менее чем на 50%.

**Таблица 20** – влияние анти-PRAME антител на рост опухоли B16F10-pSEP4-PRAME у мышей

Вариант опыта	(COO) (мм <sup>3</sup> ) через			Доля мышей с опухолью (%) через			Доля ПМ через 21 сут
	15 сут	18 сут	22 сут	15 сут	18 сут	22 сут	
Контроль	296	341	471	100	100	100	20
Инъекции ритуксимаба	245 (17)	236 (31)	253 (46)	40	80	100	60
Инъекции 6H8	142 (52)	34 (90)	39 (92)	90	90	90	30
Инъекции 6H8chim	110 (63)	85 (75)	163 (65)	90	90	90	3

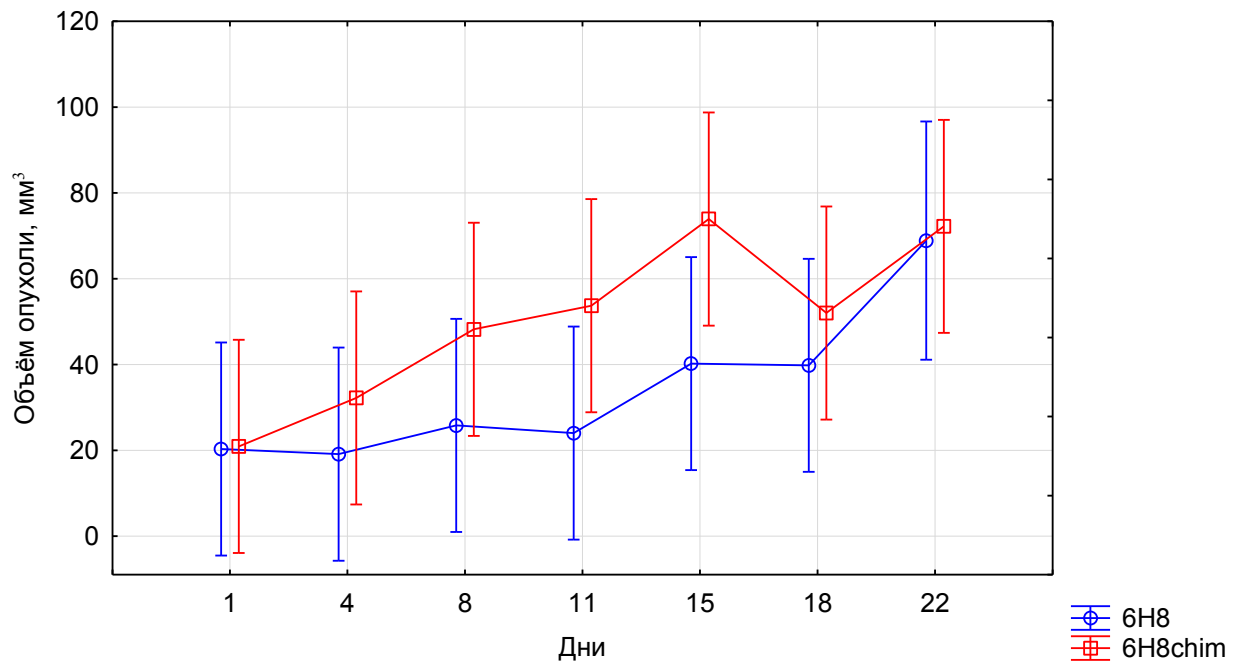


**Рисунок 65** – Скорость роста опухоли у мышей, получивших введение мышинового антитела 6H8 по сравнению с мышами, получившими введение PBS. Опухоль растёт статистически значимо медленнее при введении мышинового антитела 6H8 ( $p < 0,0001$ )



**Рисунок 66** – Скорость роста опухоли у мышей, получивших химерное антитело 6H8, в сравнении с мышами, получившими PBS. Опухоль растёт статистически значимо медленнее при введении химерного антитела 6H8 ( $p < 0,0001$ )





**Рисунок 67** – Скорость роста опухоли у мышей, получивших введение химерного антитела 6H8, по сравнению с мышами, получившими введение мышиного антитела 6H8. Статистически значимых различий нет ( $p=0,8085$ )

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

### 4.1. Значение активности гена *PRAME* в канцерогенезе

#### 4.1.1. Транскрипционные факторы, регулирующие активность гена *PRAME*

Проведённые эксперименты с использованием ингибиторов NF-κB и биоинформатический анализ баз данных о промоторах и связывающихся с ними транскрипционных факторах позволили глубже оценить регуляцию экспрессии гена *PRAME*. На основании результатов этих исследований удалось подтвердить предположение о NF-κB- и PHF8-опосредованной активации *PRAME* в опухолевых клетках.

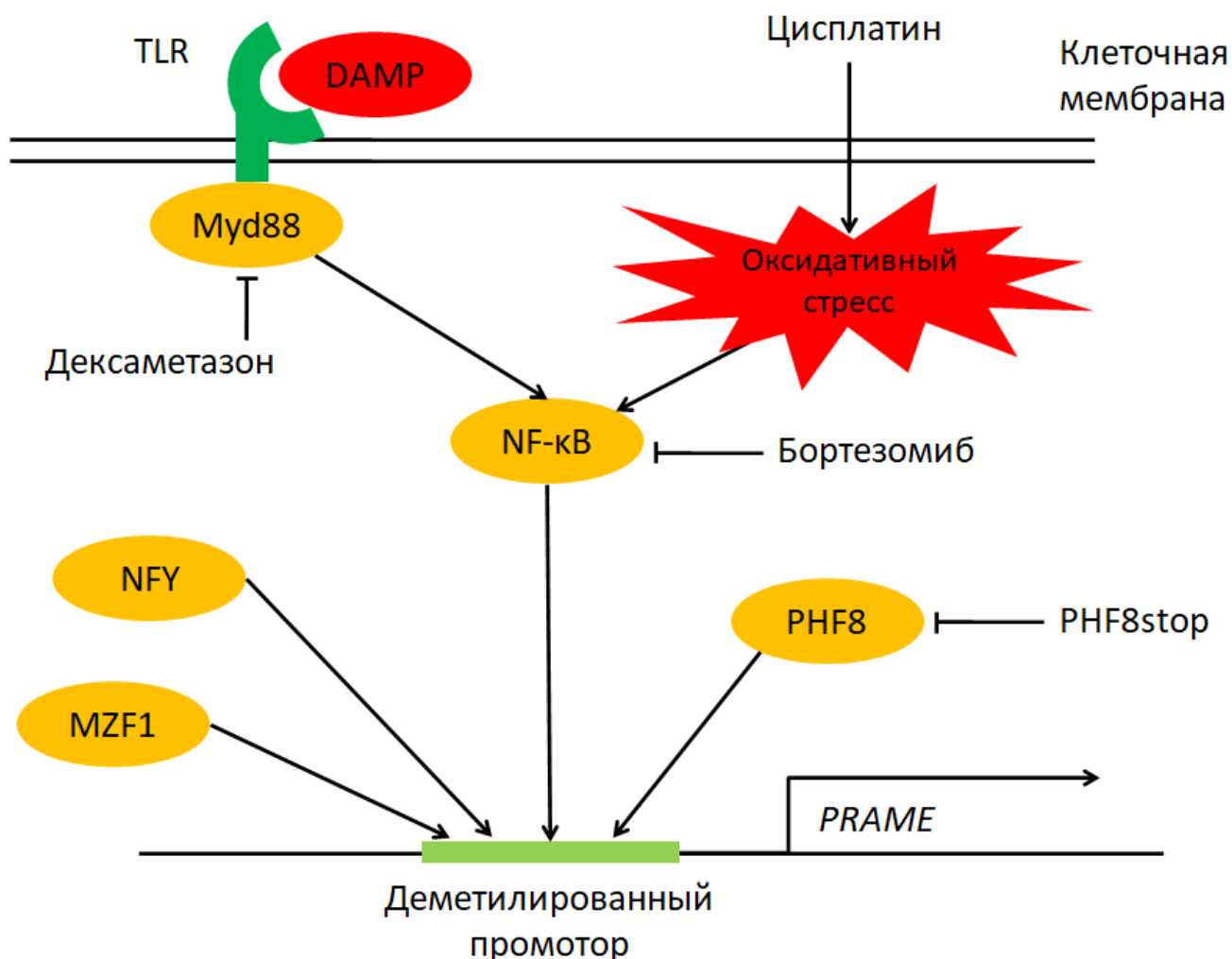
Подобно активности NF-κB, наличие в опухолевой клетке белка *PRAME* также является проонкогенным фактором. NF-κB – это активатор сигнальных путей, многие из которых отвечают за выживание клетки в условиях стресса, переключение метаболизма и пролиферацию [227]. Эти свойства NF-κB, необходимые для нормальной клетки, проявляются также и в опухолевой. Таким образом, факторы NF-κB и *PRAME* имеют много общих черт.

Из множества анализируемых транскрипционных факторов белок PHF8 представлялся наиболее вероятным регулятором активности гена *PRAME*. В нормальных условиях свойства PHF8 заключаются в активации экспрессии генов путём удаления метильной группы с гистона, предпочтительно с моно- и диметилированного гистонового белка. Профиль экспрессии PHF8 напоминает профиль экспрессии типичного раково-тестикулярного белка [228]. Располагая этими данными, мы ожидаемо наблюдали коэкспрессию *PHF8* и *PRAME* в клетках различных линий меланомы ( $p=0,0021$ ).

Таким образом, значимыми регуляторами экспрессии *PRAME* являются сигнальный путь NF-κB и транскрипционный фактор PHF8.

#### 4.1.2. Активация экспрессии PRAME в опухолевых клетках в условиях стресса

Впервые показано увеличение уровня экспрессии гена *PRAME* в опухолевых клетках, подвергнутой цитотоксическому воздействию цисплатина. Увеличение уровня экспрессии *PRAME* сопровождалось снижением чувствительности клеток меланомы к цисплатину. При этом мы выявили возможность блокирования экспрессии *PRAME* при помощи бортезомиба. Полученные нами данные позволяют построить модель внутриклеточных процессов, регулирующих активность гена в клетке меланомы (Рисунок 69).



**Рисунок 69** – Схема воздействия различных факторов на уровень экспрессии гена *PRAME* в опухолевой клетке

В клетке меланомы, исходно имеющей высокий уровень экспрессии *PRAME*, при отсутствии внешних воздействий (стрессов) не меняется активность данного гена. Создание стрессовых условий (помещение клеток в среду с цисплатином) приводит к гибели части клеток и попаданию в культуральную среду DAMPs. DAMPs ассоциируются с Толл-подобными рецепторами, которые активируют передачу сигнала по пути MyD88-NF-κB [229]. Следующим событием является быстрая NF-κB-опосредованная активация или увеличение уровня экспрессии генов, ответственных за противодействие стрессу [230]. Так как промотор гена *PRAME* имеет последовательности, распознающиеся субъединицами RelA комплекса NF-κB, увеличение активности гена будет неизбежным [33]. Значимость влияния NF-κB на экспрессию *PRAME* подтверждается эффектом бортезомиба, который, несмотря на создание стрессовых условий для клетки, блокирует передачу сигнала по данному пути. С другой стороны, применение дексаметазона не блокирует экспрессию *PRAME*. В данном случае прерывается сигнал, идущий по каскаду MyD88-NF-κB, но не прерывается на каскаде неканонической активации NF-κB.

Нужно отметить, применение бортезомиба не позволило снизить уровень экспрессии *PRAME*, а, скорее, ингибировало его увеличение. Кроме этого, дексаметазон увеличивает активность *PRAME*. Отсюда следует, что NF-κB не является единственным фактором, поддерживающим экспрессию *PRAME*.

Биологический смысл увеличения уровня экспрессии *PRAME* может заключаться в создании условий для преодоления клеткой стресса и избегания гибели. Применение цитотоксических препаратов делает *PRAME*-экспрессирующую опухолевую клетку более устойчивой к химиопрепаратам. Данная черта объясняет ухудшение прогноза у *PRAME*-экспрессирующих больных, получающих стандартную химиотерапию.

#### **4.2. Драйверные свойства *PRAME***

Прежде, чем переходить к обсуждению драйверных свойств белка *PRAME* в онкогенезе, кратко перечислим основные критерии, которым соответствует драйвер.

Трансформация клеток происходит вследствие дефектов в так называемых драйверных генах [231]. Наличие этих дефектов вызывает метаболические и функциональные нарушения в соматических клетках. Из-за смены паттерна метилирования меняется активность генов-супрессоров, что опосредует пролиферацию и генетическую нестабильность [232]. Меняется паттерн экспрессии микроРНК, вследствие чего наблюдаются нарушения в профиле экспрессии регуляторных генов [233]. Дефекты, вызванные мутациями, затрагивают также структуру белков, отвечающих за контроль клеточного цикла, репарацию и апоптоз [234, 235]. Наконец, мутации могут возникнуть в регуляторных областях, что также меняет уровень экспрессии генов и отражается на количестве кодируемого белка [236, 237]. Если какой-либо из перечисленных дефектов придаёт селективные преимущества опухолевой клетке, он может считаться драйверным.

Данные изменения являются базовыми, причём в формировании отдельно взятого драйверного дефекта может лежать несколько из перечисленных явлений. В качестве примера можно привести химерный ген *BCR-ABL*, инициирующий развитие хронического миелоидного лейкоза и некоторых случаев острого В-клеточного лимфоидного лейкоза [238]. С одной стороны, хромосомная аномалия  $t(9;22)(q34;q11)$  приводит к утрате последовательности ауторегуляторного домена белка ABL, что приводит к постоянной активации киназы BCR-ABL. С другой стороны, данная транслокация формирует химерный ген с сильным энхансером гена *BCR*, что опосредует гиперэкспрессию *BCR-ABL* на уровне мРНК. Как следствие, клетка постоянно получает ABL-подобный сигнал от киназы BCR-ABL, находящейся в избытке и не способной отключаться. Этот сигнал активирует сигнальные пути JAK/STAT и Ras/MAPK/ERK, которые, в свою очередь, поддерживают высокую скорость пролиферации и роста, а также опосредуют генетическую нестабильность [239]. Разумеется, всё это придаёт лейкозной клетке селективные преимущества, и нет никаких сомнений, что BCR-ABL представляет собой драйвер лейкемогенеза.

В становлении PRAME как драйвера участвуют деметилирование его промоторных областей [32, 156], изменение уровня экспрессии его мРНК от не выявляемого до очень высокого [10, 38, 158, 240] и функции белка, описанные в обзоре литературы.

В нашей работе показано активное участие PRAME в онкогенезе. В частности, мы сопоставили скорость роста клеток линии WI-38 с «пустым» вектором и WI-38 с гиперэкспрессией PRAME, индуцированной при помощи вектора.

Оказалось, что активность PRAME увеличила скорость пролиферации клеток WI-38 вдвое. Скорость роста клеток WI-38-PRAME была стабильной даже в среде с низким и нулевым содержанием сыворотки, в то время как родительская линия росла значительно медленнее (Рисунки 15 и 16). Для комфортного роста клеток WI-38 без экспрессии PRAME требовалось около 10% сыворотки в среде, а при содержании 5% наблюдалась постепенная гибель этих клеток. Более того, посев этих линий на полутвёрдую среду для роста клеток без твёрдого субстрата показал, что PRAME-трансфицированные клетки обладали способностью выживать и формировать колонии, тогда как родительская линия выживала в виде единичных клеток.

Исследования профиля экспрессии 20 000 генов при помощи микрочипов показали значительные изменения после трансфекции WI-38 геном PRAME. У ряда генов наблюдали более чем двукратные изменения в уровне экспрессии. Среди них были как протоонкогены, так и онкосупрессоры. Многие кодируемые ими белки задействованы в разных процессах. Так как процессы пролиферации, выживания в стадии G0 или гибели клеток контролируются многими путями, часто противодействующими, мы оценили, как выявленный профиль экспрессии генов может быть связан с увеличением скорости пролиферации и жизнеспособности клеток WI-38.

Причиной увеличения скорости пролиферации трансфицированных WI-38 может быть PRAME-опосредованная активация генов *RAB2*, *GIP3*, *ACTB*, а также снижение уровня экспрессии генов *EMP2* и *MAD2L1*. Функции этих генов хорошо

изучены. RAB2 кодирует белок-адаптер сигнального пути RAS-МАРК [241]. Активность RAS-МАРК в опухолевой клетке индуцирует ряд митогенных процессов и процессов выживания, включая пролиферацию и защиту от гибели путем апоптоза [242]. Белок G1P3 противодействует TRAIL-индуцируемому апоптозу [243]. В нашем эксперименте уровень экспрессии гена TRAIL под влиянием PRAME не изменился, хотя, ориентируясь на результаты De Carvalho et al., можно было ожидать его снижения [10]. Вырос уровень экспрессии гена, кодирующего белок актин-бета. При опухолевой трансформации увеличение числа актиновых микрофиламентов напрямую связано с усилением двигательной активности клеток, увеличением скорости инвазии и метастазирования [244]. Наконец, EMP2 и MAD2L1, чьи гены понизили уровень активности при экспрессии PRAME, отвечают за развитие апоптоза и поддержку стабильности хромосом [245, 246]. PRAME-опосредованное изменение активности перечисленных генов увеличивает жизнеспособность клетки, и может объяснить ухудшение клинического исхода PRAME-позитивных больных.

Наблюдаемая нами *PRAME*-опосредованная активация SP110 быть фактором, незначимо влияющим на трансформацию клетки. Экспрессия транскрипционного фактора SP100 запускается ретиноидами, а сам фактор стимулирует экспрессию генов, ответственных за АТРА-зависимую дифференцировку клеток. Однако ген *SP100* функционирует в основном в клетках кроветворной ткани. Функции же *SP100* в солидных опухолях не известны, и по этой причине вклад гена может быть либо нейтральным, либо антиканцерогенным [247].

Мы наблюдали активацию гена *STAT1*, который при разных условиях демонстрирует как про-, так и антионкогенные свойства. Онкосупрессорные функции STAT1 реализуются в результате подавления экспрессии *MDM2*, кодирующего белок-ингибитор p53, а также в угнетении программы ангиогенеза [248]. Однако уровень экспрессии генов *MDM2* и *TP53*, а также генов группы *VEGF* в нашем эксперименте статистически значимо не изменились. Кроме этого, ген, кодирующий STAT3, белок-партнёр STAT1, после трансфекции гена *PRAME* не

изменил свой уровень активности. Таким образом, убедительных данных за участие STAT1 в процессах PRAME-опосредованной трансформации, получить не удалось.

По данным литературы, активность ряда значимых для неопластической трансформации генов, таких как *S100A4*, *P21*, *NCOR1*, *SOX9*, *RAR $\alpha$* , *RAR $\beta$* , *CEBPA*, *CEBPE* и *YY1* меняется при повышенном уровне экспрессии гена *PRAME* [15, 19, 58, 149, 249]. Согласно нашим наблюдениям, уровень экспрессии этих генов значимо не изменился после трансфекции клеток WI-38. В структуре этих генов не обнаружено NFY-регулируемых последовательностей.

В контексте регулировки экспрессии генов комплексом NFY-PRAME несколько неожиданно выглядит изменение уровня активности SP100 – гена, не регулируемого NFY. Но самая интересная находка – увеличение уровня экспрессии раково-тестикулярных генов *MAGE A3*, *MAGE A6*, *MAGE A12*, входящих в группу *MAGE-A*.

Раково-тестикулярные гены группы *MAGE-A* расположены в локусе Xq28 хромосомы X [250, 251]. Согласно современным представлениям, гены группы *MAGE-A* функционируют как онкогенные драйверы, а не простые онкомаркеры или пассажиры глобальной дерегуляции генома [35]. Экспрессия этих генов запускается с самых первых этапов развития опухоли, ещё до проявления клинических признаков заболевания [252]. Белки группы *MAGE-A* ассоциируются с E3 RING убиквитинлигазами, образуя *MAGE-RING* лигазы (MRLs). E3 RING лигазы действуют во многих клеточных процессах. Включение в их состав белков *MAGE* приводит к различным последствиям, в том числе усилению активности лигазы, увеличению спектра субстратов для убиквитинирования и изменения локализации комплекса в клетке. *MAGE A3*, *MAGE A6*, *MAGE A12*, чьи гены были активированы геном *PRAME*, ассоциируются с убиквитинлигазой TRIM28 [253-255]. Известно, что белок *MAGE-A3/6*, гомологичный *MAGE A3* и *MAGE A6*, взаимодействует с TRIM28. Биохимический анализ показал, что комплекс TRIM28-*MAGEA3/6* усиливает процессы аутоубиквитинирования и убиквитинирования различных субстратов, в том числе опухолевого супрессора p53 и протеинкиназы



AMPK $\alpha$ 1, ответственной за извлечение энергии из жирных кислот [250, 253, 256, 257]. Следовательно, экспрессия MAGE-A3/6 в опухолевых клетках приводит к снижению активности антионкогенов и переключению клетки на режим аэробного гликолиза, что ускоряет прогрессию опухоли и повышает её жизнеспособность. В дополнение активность MAGE-A3/6-TRIM28 поддерживает активность проопухолевого сигнального пути mTOR [255, 257]. В соответствии с участием MAGE-A3/6 в регулировании AMPK и сигналов mTOR, было показано, что MAGE-A3/6-TRIM28 ингибирует аутофагию [257, 258]. Учитывая значительную гомологию белков MAGE-A3/6 и белков MAGE A3, MAGE A6 и MAGE A12, последние могут проявлять аналогичные свойства.

Важно отметить, что Shaw R.J. et al. и Pineda C.T. et al. в своих работах называют белки группы MAGE драйверами. Согласно Shaw, экспрессия MAGE-A3/6 значима для субстрат-независимого роста опухолевых клеток. MAGE-A3/6 запускает убиквитинирование и деградацию AMPK $\alpha$ 1, онкосупрессора, что способствует развитию опухоли. Влияние белков MAGE-A3/6 на онкогенез «сопоставимо или даже превосходит влияние классических онкогенов, таких как конститутивно активный мутант KrasV12» [259]. По словам Pineda, MAGE-A3/6 необходимы для выживаемости опухолевой клетки и достаточны для инициации онкогенных свойств неопухолевых клеток. «Примечательно, что стабильной экспрессии одного MAGE-A6 было достаточно, чтобы трансформировать эти клетки, что выражалось в устойчивом росте в полужидкой агарозе, независимо от подложки» [257]. Таким образом, активность *PRAME* в неопухолевых клетках приводит к активности драйверов, способствующих трансформации клеток.

Изменение в уровне экспрессии генов, наблюдаемое после трансфекции гена *PRAME*, объясняет увеличение скорости пролиферации клеток и дестабилизации генома. В итоге, в трансформированных клетках постоянно происходят новые мутации, и их фенотип становится более злокачественным. Все это способствует прогрессии опухоли.

Веским подтверждением драйверных свойств белка *PRAME* стали наблюдения за его участием в развитии химиорезистентности клеток. Ещё до

начала нашего исследования в клинической практике было замечено, что высокий уровень экспрессии *PRAME* коррелирует с меньшей чувствительностью опухоли к химиопрепаратам, что было показано для диффузной В-крупноклеточной лимфомы [116], раке мочевого пузыря [36], ретинобластоме [58]. Подтверждения были также получены при исследовании линий лимфомы Ходжкина, на которых показали прямую связь между активностью *PRAME* и резистентностью к цисплатину, этопозиду и мелфалану [113].

Следует принять во внимание, что во всех этих наблюдениях проводили сопоставление уровня экспрессии *PRAME* и химиорезистентности у разных больных и разных клеточных линий. В нашей работе мы использовали иной подход, который заключался в оценке реакции *PRAME* на изменение внешних условий в одних и тех же клетках. Мы предположили, что активность *PRAME* в стрессовых условиях может увеличиться. Действительно, при выведении линии меланомы *mel MeR*, резистентной к аранозе, стрептозотоцину и цисплатину, уровень экспрессии гена *PRAME* в этих клетках изменился. Активность *PRAME* в *mel MeR* была втрое выше по сравнению с родительской линией *mel Me* (313% vs 94% относительно гена *ABL*).

В другом эксперименте, где проводили инкубацию клеток меланомы A875 с цисплатином, также увеличился уровень экспрессии *PRAME*. После применения цисплатина в выживших клетках A875 наблюдали значительную активность гена *PRAME*. Уровень экспрессии после применения химиопрепарата составлял 27630%, что было в 3,9 раза больше по сравнению с исходной линией, имеющей уровень экспрессии 3272%. Хотя популяция клеток опухоли из одного очага может быть гетерогенна по уровню экспрессии *PRAME* [37], уцелевшие клетки, доля которых составила 50% от численности исходной популяции, имели 4-кратно больший уровень экспрессии *PRAME* по сравнению с необработанной линией. Подобное может объясняться только увеличением уровня экспрессии *PRAME*, что и выражалось в увеличении абсолютного числа молекул его мРНК.

Мы предположили, что это увеличение уровня экспрессии *PRAME* может происходить вследствие помещения клеток в стрессовые условия, вызванные

воздействием на них химиопрепаратов. Подобное уже наблюдали Wadelin et al., когда в клетках линии U937 при воздействии на них бактериальным липополисахаридом и интерфероном выросло количество мРНК *PRAME* [33].

Эти наблюдения позволяют объяснить механизм развития *PRAME*-опосредованной лекарственной резистентности у больных онкологическими заболеваниями. Экспрессия *PRAME* блокирована в соматических клетках вследствие метилирования его промотора, что делает его недоступным для транскрипционных факторов, в том числе NF- $\kappa$ B и PNF8. При этом NF- $\kappa$ B-сигналинг значительно менее активен в соматической клетке, чем в опухолевой, а количество белка PNF8 также очень низкое. В ряде случаев при развитии опухоли промотор гена *PRAME* остаётся гиперметилированным и, как следствие, мРНК гена не транскрибируется. В тех случаях, когда промотор *PRAME* частично или полностью деметилирован, ген начинает экспрессироваться, а полученный белок – увеличивать жизнеспособность опухолевой клетки. При проведении терапии часть опухолевых клеток неизбежно погибает, что приводит к образованию DAMPs. При контакте с DAMPs в выживших опухолевых клетках активируются провоспалительные сигнальные пути, в том числе NF- $\kappa$ B. В свою очередь, NF- $\kappa$ B увеличивает активность *PRAME*, что приводит к *PRAME*-опосредованному снижению чувствительности опухолевой клетки к проводимой терапии. Таким образом, клеткам опухоли даже не требуется проходить отбор, пока не появится мутация, опосредующая резистентность. Серьёзные изменения происходят быстрее на эпигенетическом уровне.

Достаточно ли *PRAME* в качестве единственного фактора для увеличения резистентности? Мы проверили это предположение, оценив IC50 цисплатина, цитарабина, доксорубицина, винкристина, мелфалана, циклофосфамида и бортезомиба для линий WI-38 и WI-38-*PRAME*. Оказалось, что клетки WI-38 с введенной в них конструкцией для экспрессии *PRAME* обладали меньшей чувствительностью ко всем химиопрепаратам ( $p < 0,02$  для каждого из них), за исключением винкристина ( $p = 0,0117$ ). Принимая во внимание изменения в профиле экспрессии генов, в том числе активации *MAGE-A3/6*, эти наблюдения не

вызывают сомнений. Примечательно то, что они были вызваны работой всего одного гена. Таким образом, нельзя отрицать драйверные свойства *PRAME*, которые проявляются не только в опухолевой клетке, но и в соматической.

### 4.3. Прогностическая значимость экспрессии гена *PRAME*

Значимость экспрессии гена *PRAME* на крупной выборке больных с сопоставлением количественного уровня экспрессии гена с клиническим исходом. Установлено, что высокий уровень экспрессии *PRAME* при ряде заболеваний связан со снижением параметров как общей, так и бессобытийной выживаемости при адренокортикальном раке, раке молочной железы, раке толстого кишечника, плоскоклеточном раке головы и шеи, светлоклеточной карциноме почки, аденокарциноме лёгкого, плоскоклеточном раке лёгкого, аденокарциноме поджелудочной железы, меланоме кожи и раке эндометрия. В других случаях, таких как папиллярный рак почки и карциносаркома матки, активность *PRAME* связана с улучшением параметров ОВ и БСВ. Вместе с тем при некоторых заболеваниях активность *PRAME* оказалась не связанной с прогнозом – при раке мочевого пузыря, плоскоклеточном раке шейки матки и эндоцервикальной аденокарциноме, раке эндометрия, опухоли зародышевых клеток, холангиокарциноме, раке пищевода, мультиформной глиобластоме, хромофобном раке почки, глиоме головного мозга, гепатоцеллюлярной карциноме, мезотелиоме плевры, серозной цистаденокарциноме яичника, раке предстательной железы, раке щитовидной железы, тимоме, раке желудка, колоректальном раке и саркоме мягких тканей. Поскольку ресурс GEPiA содержит унифицированную информацию об экспрессии множества генов в опухолевой ткани [186], мы имеем возможность оценить связь *PRAME* с клиническим исходом.

Мы показали, что существует ряд генов, коэкспрессирующихся с *PRAME* при тех заболеваниях, когда активность *PRAME* связана с ухудшением исхода. Один из таких генов, – *ADAMTS2*. Кодировать металлопротеиназу, расщепляющую белки межклеточного матрикса [260]. Функции этого белка позволяют опухолевой клетке проникать в межклеточное пространство, что увеличивает способность опухоли к инвазии и метастазированию [261]. Другие гены, *CTAG2* и *MAGEA2B*, кодируют

раково-тестикулярные белки, для которых, как и для *PRAME*, в норме характерна экспрессия в половых клетках. Функции *CTAG2* остаются неизвестными, но доказана связь между появлением данного антигена, и ухудшением клинического исхода у больных раком печени [262]. Белки группы *MAGE*, к которым относится *MAGEA2B*, способны убиквитинировать и разрушать p53, ответственный за уничтожение опухолевых клеток [263]. Функции гена *FAM69B* остаются неизвестными. Установлено только, что белок *FAM69B* активен в плаценте человека [263]. Поскольку плацента это иммунопривелегированный орган [264], *FAM69B* может снижать интенсивность воздействия на опухоль иммунной системы больного и также может быть причиной ухудшения прогноза заболевания. Наконец, ген *FAR2P2* относится к раково-тестикулярным [265]. Функции *FAR2P2* по-прежнему не установлены, и только будущие исследования могут определить его значимость при онкологических заболеваниях. В то же время некоторые из этих белков способствуют сопротивлению опухолевой клетки апоптозу, что может объяснять ухудшение прогноза у *PRAME*-экспрессирующих больных.

Вместе с тем, при таких заболеваниях как рак яичников, папиллярный рак почки и карциносаркома матки высокий уровень экспрессии *PRAME* был связан с лучшими параметрами ОБ и БСВ [40, 76, 78]. Для данных заболеваний характерна коэкспрессия *PRAME* с генами *DUSP9*, *KIF25-AS1*, *MAGEA9B*, *RNASEH1P1*, *RP11-505E24.2* и *SPATA31C1*. Некоторые из этих генов кодируют белки с антипролиферативным действием. Так, *DUSP9* представляет собой ингибитор передачи сигнала по MAP-зависимому пути. Уже было показано, что этот белок замедляет скорость деления клеток рака желудка [266]. Белок *RP11-505E24.2* является компонентом сплайсосомы [267], *RNASEH1P1* распознаёт и разрушает РНК [263]. Совместно *RP11-505E24.2* и *RNASEH1P1* стимулируют созревание и процессинг матричной РНК, что ускоряет клеточный метаболизм и делает клетку более чувствительной к химиопрепаратам. Белок *MAGEA9B*, хотя и относится к группе белков *MAGE*, изучен не так хорошо, как *MAGEA2B*, и неизвестно, может ли он убиквитинировать и разрушать p53 [253]. Наконец, *KIF25-AS1* представляет собой ген, кодирующий белок с неизвестными функциями [263]. Таким образом,

при заболеваниях, для которых характерен более благоприятный исход в случае высокого уровня экспрессии *PRAME*, часто наблюдается его коэкспрессия с генами, ответственными за снижение интенсивности клеточной пролиферации и увеличения её чувствительности к химиопрепаратам.

Наконец, во многих случаях *PRAME* коэкспрессируется с генами *LL22NC03-63E9.3*, *MAGEF1*, *MAGEA9*, *SALL2*, *SLC6A10P*, *ZNF280A*, *ZNF280B* и *ZNF74*. Согласно данным GEPiA, эти гены активны как при заболеваниях с благоприятным исходом в случае гиперэкспрессии *PRAME*, так и с неблагоприятным. Возможно, эти гены оказывают незначительное влияние на исход, являясь своеобразными спутниками *PRAME*, активными, когда активен он сам. Два гена, *ZNF280A* и *ZNF280B*, расположены в том же локусе, что и *PRAME*, и подконтрольны тому же промотору, который регулирует экспрессию *PRAME* [110]. В связи с этим коэкспрессия *PRAME*, *ZNF280A* и *ZNF280B* представляется закономерной. Другие гены, *LL22NC03-63E9.3* и *SLC6A10P*, представляют собой раково-тестикулярные гены [195, 268]. К сожалению, их функции неизвестны. Два других гена, *SALL2* и *ZNF74*, экспрессируются во время эмбрионального развития. *SALL2* функционирует во время развития тканей глаза эмбриона, но активен в некоторых тканях взрослого человека. При опухолях яичников выявлена онкосупрессорная функция *SALL2* [269]. *ZNF74* – это транскрипционный фактор с неизвестным пока спектром генов-мишеней, но при этом значимый в развитии нервной системы эмбриона [270]. Наконец, раково-тестикулярные белки группы MAGE – *MAGEA9* и *MAGEF1* часто присутствуют в опухолевой клетке вместе с белком *PRAME*, и их экспрессия не зависит от исхода заболевания. Как было отмечено выше, *MAGEA9* пока изучен плохо. Несколько больше известно о *MAGEF1*: данный белок способен распознавать и убиквитинировать субстраты посредством сближения их с убиквитинлигазами *RNF7* и *TRIP* [253]. Однако эти субстраты неизвестны, и последствия их убиквитинирования предсказать невозможно.

#### 4.4. Прогностическая значимость экспрессии *PRAME* у больных онкогематологическими заболеваниями

##### 4.4.1. Фолликулярная лимфома

У большинства больных ФЛ выявлялась активность гена *PRAME*. Экспрессия *PRAME* выявляется значимо чаще и на более высоком уровне в лимфатических узлах, субстратом опухоли в которых была ФЛ в сравнении с контрольными образцами лимфатических узлов с гистологической картиной реактивного процесса. При диагностике лейкемической фазы ФЛ и специфическом вовлечении костного мозга отмечено присутствие транскриптов *PRAME* в крови и костном мозге, соответственно. Таким образом, экспрессия гена *PRAME* является опухоль-специфическим маркером при ФЛ, а её высокий уровень свидетельствует о поражении лимфатического узла, костного мозга и присутствии клеток ФЛ в периферической крови.

Согласно нашим наблюдениям, экспрессия гена *PRAME* при ФЛ происходит чаще по сравнению с другими лимфопролиферативными заболеваниями. Например, при ДВКЛ экспрессию *PRAME* наблюдали в 32% случаев [117]; при лимфоме Ходжкина – в 22% случаев [271], при мантийноклеточной лимфоме – в 57% случаев [159], а в общей группе неходжкинских лимфом – в 44% случаев [118].

Так как высокий уровень экспрессии *PRAME* имеет негативное прогностическое значение при множестве онкологических заболеваний, мы оценили параметры ОВ и БСВ у больных ФЛ в зависимости от наличия или отсутствия у них экспрессии *PRAME*, а также от уровня экспрессии данного гена. Сопоставление пороговых значений уровня экспрессии *PRAME* позволило найти ту величину, при которой наблюдались значимые различия по ОВ между группами больных *PRAME*<sup>low</sup> и *PRAME*<sup>high</sup>. Пороговое значение экспрессии *PRAME* в клетках лимфатического узла составило 5%.

В нашей работе группа больных *PRAME*<sup>high</sup> с худшими параметрами ОВ составляла 39% от общего числа. Интересно, что Mitsuhashi et al., установившие негативное прогностическое значение гиперэкспрессии белка PRAME при ДВКЛ, выявили всего 14% больных, имеющих данный неблагоприятный признак [117].

Подобные различия могут объясняться разными патогенетическими особенностями ФЛ и ДВКЛ. С другой стороны, Mitsuhashi et al. использовали иммуногистохимический метод определения количества белка PRAME. Оценка его экспрессии проводилась двумя независимыми специалистами, но не была автоматизирована, в отличие от метода ПЦР, в котором количество транскрипта гена устанавливается более точно. Тем не менее, группа  $PRAME^{high}$  включает в себя значительную долю больных ФЛ, и для них можно предполагать худший исход по сравнению с больными из общей группы. Возможно, это отчасти связано с тем, что в исследованной группе пациентов ФЛ преобладали больные, имеющие неблагоприятные клинические характеристики и нуждающиеся в проведении терапии.

Ухудшение параметров выживаемости в связи гиперэкспрессией  $PRAME$  можно также объяснить тем, что она сопровождается увеличением уровня экспрессии Ki67, маркера пролиферативной активности, отражающего скорость деления опухолевых клеток и агрессивность заболевания, соответственно. Таким образом, чем выше активность  $PRAME$ , тем быстрее клетки делятся, и неудивительно, что это отражается неблагоприятно на исходе у больных.

Продолжая наше исследование, мы сопоставили группы больных  $PRAME^{high}$  и  $PRAME^{low}$  по прогностическим индексам FLIPI-1 и FLIPI-2, а также по отдельным признакам, на основании которых рассчитываются эти индексы (табл. 2). Один из показателей, формирующих FLIPI-1, значительно различается между больными  $PRAME^{high}$  и  $PRAME^{low}$ . Это количество зон, поражённых у больного, число которых оказалось большим у пациентов с высоким уровнем экспрессии  $PRAME$ . Данное наблюдение согласуется с данными мировой литературы, согласно которым белок PRAME коррелирует с большей массой опухоли. Так как количество поражённых зон учитывается при расчёте FLIPI-1, неудивительно, что в группе  $PRAME^{high}$  оказывается несколько больше больных, имеющих неблагоприятный прогноз по FLIPI-1, чем в группе  $PRAME^{low}$ .

В то же время из пяти признаков, формирующих FLIPI-2, ни один значимо не различается в группах больных, разделённых по признаку уровня экспрессии



*PRAME*. Мы можем проиллюстрировать это средним значением признаков FLIPI-1 и FLIPI-2 в группах больных с разным уровнем экспрессии *PRAME*. Так, у больных *PRAME*<sup>high</sup> среднее значение признака FLIPI-1 составляет 3,29, что больше по сравнению с группой больных *PRAME*<sup>low</sup>, имеющих значение признака 2,81. У больных *PRAME*<sup>low</sup> и *PRAME*<sup>high</sup> среднее значение FLIPI-2 составляло 2,29 и 2,27, что, как мы видим, практически не различается. Значения p-value не приведены, так как индекс FLIPI не является непрерывными данными, и применение критерия Манна-Уитни для их анализа было бы некорректным.

Среди причин ранней летальности следует, в первую очередь, рассматривать первичную резистентность опухоли, которая обычно предсказывается на основании имеющихся прогностических моделей. Нами дополнительно был проведен кластерный анализ имеющихся данных по таким факторам, как группа риска по FLIPI-1 и FLIPI-2, а также уровень экспрессии *PRAME*. Согласно результатам кластеризации, существует, по меньшей мере, четыре комбинации факторов. Гибель происходила в течение первых трёх лет наблюдения только в тех случаях, когда больной имел сочетание таких неблагоприятных факторов, как высокий риск по FLIPI-1/FLIPI-2 и уровень экспрессии гена *PRAME*, превышающий 5%. В данной группе выжил всего один больной. Во всех остальных группах живы все больные.

Более ранняя летальность у больных, имеющих неблагоприятный прогноз по FLIPI-1 и FLIPI-2, предсказуема. Однако учёт уровня экспрессии *PRAME* в лимфатическом узле, поражённом опухолью, дополнит информацию о вероятности наступления неблагоприятных событий. Определение высокого уровня экспрессии *PRAME* у больных, имеющих неблагоприятный прогноз по FLIPI, говорит о сочетании сразу двух неблагоприятных факторов. Наличие только одного из этих факторов, как мы наблюдали, влияет на прогноз не столь драматично. Сопоставив данные факторы между собой, клиницист получает преимущества в планировании риск-ориентированной терапии.

Мы обнаружили также корреляцию между выявлением экспрессии *PRAME* в биологическом материале и наличием опухолевого поражения. Тем не менее, на

основании количественного определения уровня экспрессии *PRAME* мы не можем делать выводы о первичном опухолевом очаге, что справедливо и для лимфоидных, и для солидных опухолей. При ФЛ уровень экспрессии *PRAME* выше в лимфатическом узле, нежели в костном мозге или периферической крови больного. Тем не менее, мы не можем утверждать, что первичным опухолевым очагом было вовлечение лимфатического узла, так как в ряде случаев при ФЛ, вовлеченная в патогенетический процесс транслокация  $t(14;18)(q32; q21)$  выявляется в костном мозге прежде, чем появляется лимфаденопатия. Таким образом, пока мы не можем однозначно оценить связь экспрессии *PRAME* с уровнем дифференцировки опухолевой клетки, тем не менее, изученный нами феномен нуждается в продолжении дальнейших исследований. Кроме того, представляется интересным анализ экспрессии *PRAME* с учетом определения дополнительных иммунофенотипических характеристик ФЛ, так как мы знаем, что именно это заболевание служит интереснейшей моделью изучения патогенеза лимфом в связи с тем, что ФЛ зачастую поликлональна. Таким образом интересно охарактеризовать опухолевый клон, обладающий свойством экспрессии *PRAME*, степень его дифференцировки и связь с клиническими характеристиками заболевания. Более того, понимание роли *PRAME* в развитии лимфопролиферативных заболеваний поможет получить новые данные о возможностях лечения, мониторинга и поддерживающей терапии ФЛ.

Таким образом, экспрессия гена *PRAME* при фолликулярной лимфоме имеет важное прогностическое значение, чему есть веские подтверждения. К ним относится ассоциация активности *PRAME* и Ki67, отражающего агрессивное течение ФЛ, а также ранняя летальность у больных, имеющих высокий уровень экспрессии данного гена и неблагоприятный прогноз по FLIPI-1 и FLIPI-2.

#### **4.4.2. Т-клеточные лимфопролиферативные заболевания**

Полученные нами данные свидетельствуют о значительной частоте активности гена *PRAME* при Т-клеточных лимфопролиферативных заболеваниях. Ген *PRAME* экспрессировался в различных биологических материалах – в лимфатических узлах и коже больных Т-кЛ. Экспрессия *PRAME* в крови и костном

мозге больных коррелировала с выявлением опухолевых клеток в периферической крови и вовлечением костного мозга, выявляемым с помощью гистологического исследования. Обнаружение транскриптов *PRAME* в таких случаях надёжно свидетельствует о наличии опухолевых клеток в крови и костном мозге. Таким образом, выявление маркера *PRAME* позволяет оценивать распространённость опухолевого процесса, особенно у больных с диагнозами ПТЛН и анапластической Т-крупноклеточной ALK+ лимфоме, а также возможно применять его в качестве маркера достижения ремиссии заболевания и её сохранения.

Интересно, что в контрольных образцах крови и костного мозга активность *PRAME* не была выявлена, однако наблюдалась в реактивных лимфатических узлах. Общий уровень экспрессии в реактивных лимфатических узлах был значительно ниже, чем в поражённых. Причины спонтанной экспрессии *PRAME* в таких случаях не были связаны с трансформацией. Активность данного гена могла быть вызвана работой провоспалительных сигнальных путей в лимфоцитах, заселивших реактивный лимфатический узел [33].

Благодаря тому, что в поражённых лимфатических узлах наблюдался большой уровень экспрессии *PRAME*, был возможен выбор такого порогового значения его активности, который позволял разделять больных на группы с относительно высоким и низким уровнем. Мы проводили границу на разном уровне и сравнивали параметры выживаемости получившихся групп больных. Оказалось, что наиболее удачным разделением оказалась граница уровня экспрессии *PRAME*, составившая 10% относительно уровня экспрессии гена «домашнего хозяйства» *ABL*. Больные, у которых *PRAME* в лимфатических узлах экспрессировался на уровне выше 10%, имели худшие параметры ОВ.

Наше наблюдение не противоречит известным данным о прогностически неблагоприятном значении высокого уровня экспрессии *PRAME* при множестве заболеваний [273, 274]. Более того, оно подтверждается связью экспрессии *PRAME* и Ki-67 в опухолевых клетках. Благодаря этому можно сделать вывод о том, что *PRAME*-экспрессирующая клетка отличается большей скоростью пролиферации. Именно это служит причиной ухудшения прогноза.

Возможный способ улучшить исход у больных Т-кЛ – это проведение трансплантации стволовых клеток. Если не рассматривать влияние уровня экспрессии *PRAME*, то больные, получившие трансплантацию (аутологичную или аллогенную), ожидаемо имели лучшие параметры ОБ и БСВ по сравнению с больными, не получившими трансплантацию (Таблица 17, стр. 135).

Если рассматривать только *PRAME*-негативных больных, то наблюдаемые ОБ и БСВ также были лучше в случаях, когда была проведена трансплантация. Однако в группе *PRAME*-позитивных больных параметры ОБ и БСВ изменились незначимо после трансплантации, что вероятно, может быть обусловлено негативным патогенетическим влиянием экспрессии гена *PRAME*.

По сумме признаков мы можем заключить, что экспрессия *PRAME* оказалась негативным фактором при Т-кЛ. В будущем для планирования терапии подобных больных следует учитывать активность гена *PRAME*, и рассмотреть возможности, которые связанные с этим.

Одна из таких возможностей – это иммунотерапия против *PRAME*-экспрессирующей клетки [31]. Данный способ возможен благодаря тому, что наличие эпитопов белка *PRAME* отличает опухолевую клетку от здоровой. Клетка становится уязвимой перед такими средствами как моноклональные антитела или Т-клетки, трансфицированные химерным рецептором, распознающим эпитопы *PRAME* [31, 274].

Другая возможность заключается в использовании уже известного средства, эффективного при экспрессии *PRAME* у онкогематологических больных. Это бортезомиб, показавший одинаковую эффективность у больных *PRAME*-позитивной и *PRAME*-негативной множественной миеломой [20, 104, 105, 275], в то время как иные препараты были менее эффективными в группе больных, опухоль которых была *PRAME*-негативна. Бортезомиб эффективен благодаря ингибированию протеасом. Свойства белка *PRAME* тесно связаны со свойствами убиквитинлигазы Cull 2 [9]. Предполагается также, что *PRAME* сам является субстрат-распознающей единицей данной убиквитинлигазы, и отправляет белковые субстраты на деградацию в протеасоме.

Применение бортезомиба не позволяет белку *PRAME* реализовать свойства распознавания субстрата. Вероятно, по этой причине клинический исход у больных *PRAME*-экспрессирующей множественной миеломой, получивших бортезомиб, улучшился. Мы предполагаем, что использование бортезомиба в терапии больных *PRAME*-экспрессирующей Т-кЛ может улучшить показатели выживаемости. Разумеется, для этого нужно провести специальные клинические испытания.

#### **4.4.3. Множественная миелома**

При множественной миеломе у больных наблюдалась коэкспрессия *PRAME* и генов группы *MAGE*, что согласуется с нашими результатами, полученными на микрочипах. При сопоставлении результатов терапии и выживаемости больных в зависимости от уровня экспрессии *PRAME* не было обнаружено никаких особенностей. Наш результат согласуется с наблюдениями Qin et al. о том, что при множественной миеломе бортезомиб отменяет негативное влияние *PRAME* на исход заболевания [106]. Отсутствие связи уровня экспрессии *PRAME* и выживаемости больных в нашем исследовании объясняется применением бортезомиба во всех проведённых линиях терапии. Таким образом, введение бортезомиба в клиническую практику было успешным, и позволило превратить *PRAME* из негативного прогностического признака в нейтральный.

#### **4.4.4. Значение экспрессии генов *PRAME* и *PML-RAR $\alpha$* при определении риска развития рецидива острого промиелоцитарного лейкоза**

В литературе накапливаются сведения о том, что экспрессия гена *PRAME*, необходимого в процессе сперматогенеза, в случаях солидных опухолей говорит о высокой злокачественности опухолевой клетки и о том, что сам опухолевый процесс достиг значительной стадии [122]. Но при рассмотрении острых миелоидных лейкозов и особенно острого промиелоцитарного лейкоза, заметили, что активность этого гена, а именно количественная характеристика его экспрессии, каким-то образом связана с более благоприятным прогнозом [136].

В данный момент данные литературы не в полной мере отражают информацию о связи *PRAME* с регуляторными путями лейкозной клетки. По этой

причине можно только приближённо судить о вероятной причине положительного влияния этого объекта на прогноз заболевания. Возможно, имеет место эффект участия белка PRAME в метаболизме ретиноевой кислоты. Некоторые продукты переработки ретиноидов обладают более выраженной токсичностью, чем витамин А или сама трансретиноевая кислота. Если это действительно так, то на лейкозную клетку действует дополнительный токсический эффект метаболитов ретиноевой кислоты. И чем выше уровень экспрессии PRAME, тем более выражен данный эффект. Нам удалось показать прямую зависимость времени безрецидивной выживаемости от первоначального уровня синтеза мРНК внутри лейкемической клетки.

Зарубежные исследователи Santamaria et al. на данные которых мы опирались, делали расчёт количества мРНК *PRAME*, исходя из величины экспрессии этого гена в клетках костного мозга здоровых доноров [161]. Мы провели исследование образцов костного мозга пациентов из обширной референсной группы и показали, что лишь у немногих из них, несмотря на онкогематологические заболевания, в кроветворной ткани происходит активация *PRAME*. Что же касается пациентов с диагнозом ОПЛ, то нами впервые было показано, что при этом заболевании существует очень тесная связь между химерным геном *PML-RAR $\alpha$* , и раково-тестикулярным геном *PRAME*. При других онкозаболеваниях с распространёнными процессами мы также получили новые данные, что *PRAME* экспрессируется у всех таких пациентов. Однако в случае меланомы, например, данный маркер обнаружили у 88% пациентов. Santamaria et al., изучая ОПЛ, смогли показать, что *PRAME* появляется в дебюте заболевания у многих, но не у всех пациентов.

Ещё одним доводом о пользе нашей экспериментальной системы служит то, что нам удалось показать совместное влияние генов *PML-RAR $\alpha$*  и *PRAME* на прогноз заболевания. Полученный результат при этом не противоречит классическим исследованиям, показавшим, что изотип *bcg3* связан с наихудшим прогнозом при ОПЛ [143]. К этому мы можем добавить, что в действительности худший прогноз определяется количественным отношением *PRAME* к *PML-RAR $\alpha$*

изотипа bcr3. Таким образом, мы сделали более точным определение группы риска при ОПЛ у взрослых и рекомендуем производить измерение уровня экспрессии гена *PRAME* в дебюте заболевания для её скорейшего установления.

#### **4.5. Перспективные направления таргетной терапии *PRAME*-экспрессирующих заболеваний**

##### **4.5.1. Воздействие на уровне синтеза мРНК *PRAME***

Полученные данные позволяют констатировать, что для успешной терапии опухолевых заболеваний может иметь большое значение блокирование экспрессии гена *PRAME* или свойств, которыми обладает белок PRAME. Мы можем выделить, по меньшей мере, три направления анти-PRAME-терапии.

Первое направление – воздействие на уровне гена *PRAME*. Один из возможных способов – инактивация этого гена методами РНК-интерференции. Примером успешного применения является терапия при болезни Хантингтона. Заболевание вызвано наработкой в клетках мозга мутантного белка mHTT, обладающего аномально удлинённым полиглутаминовым мотивом [276]. Терапия основана на РНК-интерференции, которая предотвращает наработку белка mHTT, но сохраняет нормальный белок HTT [277]. Обсуждается возможность использования системы CRISPR-cas9 для инактивации гена *mHTT*, что позволит больному отказаться от постоянного приёма препаратов для РНК-интерференции. Таким образом, в будущем может быть поднят вопрос об инактивации гена *PRAME* системой CRISPR-cas9 или иными способами.

Уже сейчас можно дать оценку перспективам инактивации гена *PRAME*. Прежде всего, мы должны учитывать вероятную связь между экспрессией *PRAME* в эмбриональный период развития человека и процессами формирования центральной нервной системы, что следует из наблюдения полиморфизмов генов семейства *PRAME* у больных аутизмом [278]. Кроме этого, белок PRAME необходим в процессах созревания сперматозоидов млекопитающих и человека, а дисфункции одноимённого гена могут привести к мужской стерильности [279]. Наконец, активность генов семейства PRAME значима для самых ранних этапов эмбриогенеза, что было показано на мышах. Так, нокаут *PRAMEL7* в мышечной

зиготе приводил к блокированию развития на стадии морулы [89]. Таким образом, частичное нарушение структуры гена *PRAME* и гомологичных ему генов может привести к нарушениям формирования когнитивных и фертильных функций человека, а полная инактивация – к невозможности завершения ранних стадий эмбриогенеза. Таким образом, *PRAME* оказался значимым фактором для полноценного развития человеческого эмбриона.

Если вносить изменения в структуру гена *PRAME* в эмбриональных или половых клетках не желательно, остаётся возможность влиять на его активность в тканях взрослого человека. Неактивность *PRAME* в нормальных тканях позволяет надеяться, что меры по инактивации экспрессии этого гена в опухоли не нанесут никакого ущерба организму в целом. При этом снижение уровня экспрессии *PRAME* в опухолевых клетках понизит их скорость пролиферации, уменьшит резистентность к химиопрепаратам и апоптозу. Всё это увеличит эффективность терапии. Достигнуть этого можно при помощи соединений, блокирующих транскрипционный фактор PNF8 или сигнальный путь NF-κB.

К настоящему моменту известно множество подходов для блокирования NF-κB, в числе которых применение бортезомиба [280] и других молекулярных ингибиторов. PNF8 остаётся малоизученной мишенью, и в своей работе мы не стали использовать малые молекулы, поскольку ни одно из существующих не используется как лекарственный препарат и не производится в России. В связи с этим мы разработали тиопроизводный олигонуклеотид для инактивации гена *PNF8*. Мы назвали его PNF8stop. Как показали результаты использования PNF8stop на *PRAME*-экспрессирующих линиях меланомы, данное соединение действительно снижало уровень экспрессии сначала *PNF8*. Вслед за снижением количества мРНК *PNF8* уменьшался и уровень экспрессии гена *PRAME*. Как мы наблюдали на клетках линии меланомы A875, длительное воздействие PNF8stop приводило к снижению скорости их роста и гибели.

По ряду причин мы не рассматриваем PNF8stop как лекарственный препарат. В числе этих причин высокая стоимость синтеза данного соединения, сопровождающегося получением значительного количества ядовитых веществ, и



относительно небольшое время полужизни в организме [281]. Однако RNF8stop хорошо проявило себя как модельная молекула, показавшее возможное направление анти-PRAME терапии. Если RNF8stop способно нейтрализовать экспрессию гена *PRAME* и сделать опухолевую клетку менее жизнеспособной, этого можно достичь и другими способами. Например, вполне возможно синтезировать молекулу, препятствующую работе транскрипционного фактора RNF8. Пример механизма работы такой молекулы – её специфическое связывание с активным центром RNF8, вследствие чего белок не сможет проводить модификацию гистонов [282]. Мы ожидаем, что чем большим сродством к RNF8 будет обладать данная молекула, тем безопаснее для человека она будет.

К настоящему моменту в научной литературе мы не встречали исследований, посвященных подходам по инактивации экспрессии гена *PRAME* для терапии онкологических заболеваний. Но мы предполагаем, что это направление стоит развивать, поскольку оно позволит получить новый мощный метод терапии опухолевых заболеваний.

#### 4.5.2. Терапия на уровне белка PRAME

Второе направление таргетной терапии PRAME-экспрессирующих опухолей – блокирование работы самого белка PRAME. Функции PRAME заключаются в распознавании белковых субстратов и их убиквитинировании с последующей деградацией. У человека эти субстраты неизвестны. У мыши субстратом является белок UHRF1 [89]. UHRF1 предназначен для воспроизводства паттерна метилирования в делящихся эмбриональных клетках. PRAME-опосредованное UHRF1 разрушение приводит к невозможности размещения метильных групп на новосинтезированной ДНК, в результате чего в новых клетках полностью меняется паттерн экспрессии генов [89]. Что касается человека, активность PRAME неизвестным пока образом связана с запуском экспрессии генов, ответственных за преодоление стрессовых условий, переключения метаболизма и инициации пролиферации. Данная группа генов в основном находится под контролем NFY-регулируемых промоторов [9]. Возможно, белок PRAME вместе с транскрипционным фактором NFY убиквитинирует репрессорные белки. После

разрушения этих белков запускается активность ранее репрессированных генов. Как известно, для деградации убиквитинированных белков необходимы протеасомы [9]. Мы предположили, что блокирование протеасом приведёт к сохранению PRAME-распознаваемых субстратов, вследствие чего наличие PRAME в клетке окажется незначительным фактором. В результате этого PRAME-позитивная опухолевая клетка лишится преимуществ экспрессии в ней белка PRAME.

Наше предположение подтвердилось на практике. Мы использовали известный ингибитор протеасом бортезомиб. Этот препарат широко применяется в клинической практике, особенно в терапии множественной миеломы [283]. Интересно, что при сравнении чувствительности клеток WI-38 (родительской линии) и WI-38-PRAME (линии WI-38 с трансфицированным геном PRAME), для последней линии было установлено меньшее значение IC50 бортезомиба. Учитывая, что скорость пролиферации клеток WI-38-PRAME была выше, чем у родительской линии, именно за счёт экспрессии белка PRAME, очевидно, что бортезомиб оказывает значимое воздействие на данный фактор. Таким образом, мишенью для бортезомиба является не только протеасома, но и белок PRAME, который зависит от протеасом.

В экспериментах по коинкубации различных клеточных линий с бортезомибом в небольших концентрациях и другими химиопрепаратами мы наблюдали увеличение чувствительности опухолевых клеток к исследуемым цитостатикам. В числе рассмотренных химиопрепаратов были цисплатин, цитарабин, доксорубин, винкристин, мелфалан и циклофосфамид. После добавления в культуральную среду бортезомиба чувствительность PRAME-позитивных клеточных линий увеличилась ко всем химиопрепаратам, кроме винкристина.

Почему эффект бортезомиб-опосредованного увеличения чувствительности клеток к другим химиопрепаратам оказался не универсальным? Для этого нужно разобраться в механизмах действия каждого из исследованных химиопрепаратов. Как известно, винкристин представляет собой алкалоид, блокирующий

полимеризацию тубулина. Подобное свойство приводит к остановке формирования микротрубочек, необходимых для создания веретена деления и сегрегации хромосом [284]. В результате делящиеся клетки не могут завершить стадию мейоза. Благодаря этому винкристин эффективен для терапии острых лейкозов, для которых характерна очень быстрая пролиферация клеток [285]. При этом эффект винкрестина не зависит от эффективности работы протеасом, в то время как бортезомиб практически не оказывает влияния на переработку компонентов цитоскелета. Именно этим объясняется отсутствие синергизма между бортезомибом и винкрестином.

В отличие от винкрестина, цитотоксический эффект остальных химиопрепаратов обладает значительной связью с метаболизмом белков. Так, основным механизмом действия цисплатина заключается в его способности связываться и повреждать ДНК. Содержащийся в цисплатине атом платины образует координационные связи между соседними основаниями ДНК, формируя сшивки. Эти сшивки могут быть непреодолимы для транскрипционных и репарационных комплексов. В результате нарушается синтез мРНК и транскрипция ДНК, что приводит к гибели клетки. Препарат применяется для лечения множества онкологических заболеваний, в том числе меланомы, нейробластомы, В- и Т-клеточных лимфомах [286]. Помимо ДНК-тропного воздействия, цисплатин провоцирует образование свободных радикалов, которые также запускают каскад реакций, приводящих к клеточной гибели. Прежде всего, свободные радикалы повреждают белки, из-за чего последние могут утратить свои функциональные свойства, превращаясь в своеобразный балласт. Переработка повреждённых белков в протеасомах, с одной стороны, освобождает клетку от этих белков, с другой стороны, возвращает материал для синтеза новых. Проводя повторный синтез белков, опухолевая клетка таким образом деактивирует молекулы цисплатина.

Белок PRAME также вносит вклад в резистентность опухолевой клетки к цисплатину. Если белок PRAME присутствует в клетке опухоли, он функционирует как активатор ответа на стресс. Возможно, PRAME способен активировать

экспрессию белков, ответственных за противодействие стрессу в случае повреждения ДНК. Пока этот процесс не открыт, и остаётся предположением. Но PRAME-опосредованная активация антистрессовой программы в ответ на наличие в клетке свободных радикалов уже наблюдалась ранее. Функции PRAME связаны с работой белка Nrf2, который в свою очередь отвечает за преодоление последствий отравления клетки свободными радикалами и тяжёлыми металлами [287]. Вместе с этим, активацию экспрессии гена *PRAME* во время стресса, вызванного инкубированием опухолевых клеток с цисплатином, наблюдали и мы. Таким образом, клетка может использовать PRAME для своего выживания при попадании в неё цисплатина, в то время как бортезомиб этому препятствует.

Что касается других применённых нами химиопрепаратов, их эффект также связан с повреждением белков, хотя и не является основным. Доксорубицин, например, блокирует синтез ДНК путём интеркаляции в её структуру и затруднения работы топоизомеразы II. Кроме этого, доксорубицин стимулирует образование свободных радикалов, повреждающих белки [288].

Цитарабин – антиметаболит со сходной с цитозином структурой молекулы. Наличие остатка арабинозы в цитарабине позволяет системе синтеза ДНК распознавать его как чужеродный компонент, вследствие чего он используется в процессах репарации и репликации. Однако участок ДНК со встроенным в него арабинофурнозилцитозинон трифосфатом оказывается непригодным для продолжения репликации. В результате цитарабин блокирует клеточный цикл на стадии S-фазы. Неудивительно, что особенно чувствительными к цитарабину оказываются быстроделющиеся клетки. Благодаря таким свойствам цитарабину нашли применение для лечения онкогематологических заболеваний, таких как острые лейкозы и лимфомы. По сравнению с цисплатином, цитарабин обладает более выраженным ДНК-тропным эффектом, так как формирует значительно меньше свободных радикалов.

Мелфалан это алкилирующий агент, присоединяющий алкильную группу к ДНК, в основном к гуаниновым основаниями. Применяется для терапии

множественной миеломы [289], рака яичников, меланомы и ретинобластомы [290]. Мелфалан действует в довольно больших концентрациях [291].

Наконец, циклофосфамид метаболизируется в клетках, имеющих низкую активность ALDH. Образовавшееся активное вещество обладает способностью алкилировать ДНК, что, как в случае с цисплатином и цитарабином, вызывает апоптоз. Высокий уровень активности ALDH предохраняет нормальные клетки костного мозга и печени от повреждающего эффекта циклофосфамида [292], что облегчает его применение. Подобно цисплатину, циклофосфамид также вызывает формирование свободных радикалов [293].

Таким образом, все исследованные нами химиопрепараты, за исключением винкристина, способны генерировать свободные радикалы, которые повреждают белки клетки. Появление свободных радикалов, нарушения синтеза ДНК, нарушения работы ключевых сигнальных путей и другие последствия отравления химиопрепаратами, несомненно, воспринимаются клеткой как стресс, что инициирует экспрессию белка PRAME на большем уровне. В свою очередь PRAME помогает клетке преодолеть условия стресса и выжить. По этой причине увеличивается резистентность опухоли к химиопрепаратам, что понижает эффективность лечения. Добавление бортезомиба, с одной стороны, частично блокирует экспрессию PRAME, с другой стороны, отменяет эффекты, опосредованные белком PRAME.

Вследствие этого подход к терапии посредством воздействия на белок PRAME может быть эффективен. Возможный уже в настоящее время способ заключается в ингибировании протеасом. Ингибирование предотвратит разрушение субстратов PRAME, и они смогут продолжить выполнять свои функции. Фактически, клетка будет активировать экспрессию PRAME для собственного выживания, но эффект не будет достигнут.

Особенно важно то, что бортезомиб не является единственным агентом, позволяющим добиться этого. Могут применяться и другие блокаторы функций протеасом, такие как карфилзомиб или иксазомиб. Возможна также разработка

малых молекул, препятствующих сборке белкового комплекса Cull-PRAME, и множество других способов.

Мировая практика располагает данными об эффективности бортезомиба при ММ [105, 283]. До появления бортезомиба выживаемость этих больных значительно ухудшалась в случае экспрессии *PRAME*. Когда бортезомиб внедрили в схемы лечения, активность *PRAME* утратила прогностическое значение [105].

#### 4.5.3. Терапия на уровне *PRAME*-экспрессирующей клетки

Наконец, третье направление *PRAME*-направленной терапии – иммунотерапия. Это направление реализуемо за счёт того, что белок *PRAME* находится на поверхности *PRAME*-экспрессирующей клетки, что наблюдали как зарубежные авторы, так и наша группа [125, 294, 295]. Возможность проведения такой терапии уже показана нами экспериментально как в условиях *in vitro*, так и в экспериментах на мышах.

Антитело, распознающее поверхностный белок *PRAME*, может быть модифицировано многими способами. Например, созданные нашей группой антитела 5D3 и 6H8 прошли химеризацию и гуманизацию, что может послужить основой новых лекарственных препаратов. Однако это не является пределом возможностей их дальнейшего совершенствования. Природные антитела, а также близкие к ним химерные и гуманизированные, привлекают к опсонизированным клеткам молекулы системы комплемента, либо киллерные клетки, которые осуществляют контактный лизис или запускают апоптоз. Кроме использования антител для привлечения данных эффекторов, их можно модифицировать для доставки различных токсинов или целых клеток к *PRAME*-экспрессирующим мишеням. Так, возможно создание иммунотоксина, в котором антиген-распознающий домен антитела будет конъюгирован с молекулой токсина, которым может быть, например, дифтерийный токсин. Возможно использование переменного домена для создания CAR-рецептора, встроенного в киллерную клетку, которая при введении в организм больного распознает и атакует опухоль.

Ещё один интересный способ заключается в использовании естественно сформировавшегося Т-клеточного рецептора, распознающего эпитопы белка

PRAME в комплексе с молекулами HLA [296]. Последовательность мРНК данного рецептора может быть клонирована и использована для создания CAR-рецептора. Метод не лишён недостатков, связанных, прежде всего, с развитием иммунного ответа исключительно по тем мишеням, что экспрессируют соответствующую молекулу HLA. Но в тех случаях, когда опухолевая клетка экспрессирует молекулу HLA нужного изотипа и эпитопы белка PRAME, иммунный ответ будет очень эффективным.

Разумеется, методы иммунотерапии не ограничиваются применением антител, Т-клеточных рецепторов и их производных [297]. Гибкость иммунотерапевтического подхода подтверждается клинической практикой терапии PRAME-экспрессирующих онкологических заболеваний. Однако эти подходы имеют не только преимущества, но и недостатки (Таблица 21).

Дендритноклеточные вакцины и вакцины белковой природы, в том числе пептидные, стимулируют иммунный ответ против PRAME *опосредованно*. Эти вакцины не ограничены репертуаром молекул HLA больного, за исключением случаев создания аллогенных дендритноклеточных вакцин. Преимущества подобных вакцин – возможность развития мультиэпитопного ответа против антигена PRAME. Однако практика показала, что подобные подходы лишь в единичных случаях приводят к развитию CD8-зависимого ответа, и часто – к развитию CD4-зависимого ответа. В зависимости от своих функций PRAME-специфические CD4-экспрессирующие Т-клетки могут стимулировать разные типы ответа. Возможно стимулирование В-клеточного ответа, CD8-зависимого, неспецифического цитотоксического и даже индукция толерантности.

К сожалению, в исследованиях эффективности вакцинирования больных, не был раскрыт иммунофенотип обнаруженных CD4-положительных клеток, и их функции можно предположить только на основе анализа полученных данных. Эти данные были следующими: CD8-положительные клетки не обнаружены, методика определения титра PRAME-специфических антител в сыворотке вызывает вопросы, а потеря клинической эффективности не была связана с потерей целевого антигена.

**Таблица 21** – Сравнение результативности различных подходов терапии против PRAME

Основа препарата	Преимущества	Недостатки	Результаты применения в ксенотрансплантационных моделях	Результаты применения в клинических исследованиях
Дендритные клетки	Возможно развитие CD8-зависимого и Ig-опосредованного ответа против значительного числа эпитопов PRAME	Может привести к развитию толерантности к PRAME	Не применялись	Неуспешны. Стимулировали развитие CD4-зависимого ответа
CD8-положительные Т-клетки, распознающие PRAME	Гарантированное поражение опухолевых клеток и возможность применения большой массы специфичных Т-клеток со встроенным «суицидальным геном»	Узкая специфичность и риск иммуноредактирования	Успешный контроль роста опухоли	Не применялись



Основа препарата	Преимущества	Недостатки	Результаты применения в ксенографтных моделях	Результаты применения в клинических исследованиях
Пептидные или рекомбинантные белки	Возможно развитие CD8-зависимого и Ig-опосредованного ответа против значительного числа эпитопов PRAME	Неприменимы при иммунодефицитных состояниях и могут привести к толерантности за счёт развития регуляторных клеток	Наблюдался CD8-зависимый ответ против PRAME-экспрессирующих клеток	В лучшем случае наблюдалась стабилизация заболевания. В основном развивался CD4-зависимый ответ. В единичных случаях – CD8-зависимый
Антитела	Эффективность при лейкозах, создание иммуноконъюгатов, цитостатический эффект	Узкая специфичность и иммуноредактирование, меньшая эффективность при солидных опухолях	Успешный контроль роста опухоли	Не применялись

Вследствие этого можно предположить, что CD4-положительные клетки, продуцированные в результате вакцинации, были регуляторными клетками, ограничившими ответ против антигена PRAME. Хотя развитие Th1-клеток, стимулирующих гуморальный ответ против PRAME, не исключается, вакцинация больных ДК или белком может приводить к толерантности к важному опухолевому антигену.

Следует уточнить, что тип иммунного ответа напрямую связан с функциями дендритных клеток. В экспериментах на животных установлено, что ДК, введённые внутривенно, с большей вероятностью стимулируют CD4-положительные клетки. При подкожном введении увеличивается интенсивность CD8-опосредованного иммунного ответа [298]. Относительно недавно выявили субпопуляцию ДК, в которых функционируют транскрипционные факторы IRF8 и BATF3. Одна из функций данных ДК заключается в активации Т-киллеров и противоопухолевом иммунном ответе [299]. Вакцины, основанные на IRF8/BATF3-зависимых ДК, могут показать значительную эффективность при иммунотерапии против PRAME-экспрессирующих опухолей.

В отличие от ДК и вакцин белковой природы, специфические антитела или CD8-положительные клетки действуют *напрямую* против PRAME-экспрессирующих клеток. Недостаток подобных методов заключается в узкой специфичности и связанным с этим риском иммуноредактирования опухоли. Но так как PRAME является важным драйвером канцерогенеза, его потеря в целом снизит жизнеспособность опухолевых клеток, особенно при солидных опухолях [88, 300]. Таким образом, иммуноредактирование не может быть ограничивающим фактором. Ещё одно преимущество PRAME-специфичных Т-киллеров и моноклональных антител заключается в том, что данные препараты в малой степени зависят от состояния иммунной системы больного. Т-киллеры могут быть модифицированы таким образом, что всегда будут иметь активированный иммунофенотип. Этого можно достичь, встроив в клетки ген для экспрессии IL-2, например. Антитела могут вызывать различные эффекты, прежде всего,

перфорацию мембраны PRAME-экспрессирующих клеток натуральными киллерами или белками системы комплемента.

Ограничения использования Т-киллеров – побочные эффекты в виде «цитокинового шторма», вполне преодолимы уже в настоящее время. Могут возникать затруднения, связанные с несовпадением репертуара HLA у Т-клеток и тканей реципиента. Проблема гистосовместимости может быть решена путём выделения лимфоцитов из организма самого больного. Применение векторов для экспрессии CAR в этих клетках позволит выиграть время для терапии, а также сделает клетки более управляемыми для снижения побочных эффектов.

Антитела могут быть малоэффективными в случае солидных опухолей, при которых малигнизированные клетки образуют многослойные структуры. Большинство клеток в таких структурах не имеет физического контакта с препаратом. Однако антитела можно использовать как средство доставки токсинов или радиоактивных агентов. Наконец, цитотоксический эффект антител, распознающих PRAME, может оказаться значимым при терапии.

Применение иммунотерапии связано с определенными проблемами. В тех случаях, когда масса опухоли велика, действие клеток-эффекторов или антител может привести к синдрому распада опухоли, «цитокиновому шторму» и связанным с этим неблагоприятным явлениям. Применение иммунодепрессантов для смягчения последствий сделает саму терапию неэффективной. Результаты применения ДК или белковых вакцин начнут проявляться не сразу, и может просто не хватить времени для развития противоопухолевого ответа. Наконец, сочетание вакцинирования и химиотерапии может нарушить свойства АПК, и результат будет непредсказуемым.

Наиболее подходящим представляется тот момент, когда количество опухолевых клеток минимально. Например, это может быть при хирургическом удалении опухоли или после успешного проведения химиотерапии. Иначе говоря, в ремиссии заболевания, и при наиболее благоприятном состоянии иммунной системы, когда количество супрессорных клеток минимально. В отсутствие супрессии разовьются клетки-эффекторы и возьмут под контроль остаточные

образования. В таком случае можно рассчитывать на предотвращение рецидива или хотя бы смягчения его последствий, так как PRAME-экспрессирующие клетки будут уничтожены.

Поскольку PRAME-распознающие CD8-экспрессирующие клетки в небольшом числе существуют в организме каждого здорового человека, можно проводить превентивную вакцинацию для активации данных клеток.

В любом случае, PRAME экспрессируется практически у половины больных онкологическими и онкогематологическими заболеваниями. Чтобы улучшить результативность противоопухолевой терапии, необходимо использовать этот маркер опухолевой клетки в качестве мишени.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для гена *PRAME* характерна спонтанная экспрессия в опухолевой клетке, в то время как в соматических тканях взрослого человека эти гены неактивны. Обладая свойствами блокировать дифференцировку и апоптоз в опухолевой клетке, *PRAME* функционирует как драйвер. На клиническом уровне это проявляется в виде ухудшения параметров выживаемости больных онкологическими и онкогематологическими заболеваниями, в числе которых аденокортикальный рак, рак молочной железы, рак толстой кишки, плоскоклеточный рак головы и шеи, папиллярный рак почки, светлоклеточная карцинома почки, аденокарцинома легкого, плоскоклеточный рак легкого, аденокарцинома поджелудочной железы, меланома кожи, карциносаркома матки, фолликулярная лимфома и Т-клеточные лимфопролиферативные заболевания. Уровень экспрессии *PRAME* прямо коррелирует с химиорезистентностью опухолевых клеток и скоростью их пролиферации. С другой стороны, блокирование экспрессии гена *PRAME* или функций белка *PRAME* увеличивает чувствительность к химиопрепаратам.

Частота встречаемости активного *PRAME* опосредует значительный интерес к разработке способов терапии *PRAME*-экспрессирующих заболеваний. Особенность экспрессии *PRAME*, которая заключается в её опухоль-ограниченном характере, позволяет разрабатывать подходы таргетной терапии.

Первый из возможных подходов – ингибирование регуляторов экспрессии *PRAME* для снижения уровня экспрессии последнего. До выполнения нашего исследования этих регуляторы были неизвестны. Мы установили, что с промотором гена *PRAME* ассоциируются транскрипционные факторы NF- $\kappa$ B и PNF8. PNF8 представляет собой особый интерес ввиду опухоль-специфической экспрессии. По сравнению с NF- $\kappa$ B, PNF8 менее значим для взрослого человека, так как функционирует в основном на эмбриональной стадии развития. В опухолевых клетках, согласно нашим результатам, активность *PNF8* коррелирует с активностью *PRAME*, а нокаут *PNF8* приводит к снижению уровня экспрессии *PRAME*. В результате может быть решена проблема, связанная с *PRAME*-

опосредованной химиорезистентностью опухолевых клеток, что и было продемонстрировано нами на линии меланомы A875, обработанной тиопроизводным олигонуклеотидом для нокаута *PRAME* с последующим снижением уровня экспрессии *PRAME* и уменьшением IC50 цисплатина.

Второй возможный подход заключается в блокировании функций белка *PRAME*. Функции белка *PRAME* проявляются путём убиквитинирования и деградации белков-мишеней в протеасомах. Если деградацию белков предотвратить, активность *PRAME* перестанет влиять на опухолевую клетку. Для этого может быть использован ингибитор протеасом, например бортезомиб. В нашей работе установлено, что бортезомиб обладает синергизмом с цисплатином, цитарабином, доксорубицином, мелфаланом и циклофосфамидом. Цитотоксическое воздействие бортезомиба и любого из этих химиопрепаратов проявляется против *PRAME*-гиперэкспрессирующих клеток меланомы A875 и рака молочной железы SK-BR-3, а также против клеток линии WI-38 с индуцированной экспрессией *PRAME*. Эффект был менее выраженным по отношению к клеткам рака лёгкого A549 с относительно небольшим уровнем экспрессии *PRAME*, практически не проявился при воздействии на *PRAME*-низкоэкспрессирующую линию рака толстой кишки HCT-116 и не проявился при воздействии на *PRAME*-негативную линию WI-38. Наши результаты подтверждаются наблюдениями за ответом на терапию больных множественной миеломой, в схемы лечения которых входит бортезомиб. Активность *PRAME* при данном заболевании перестала быть негативным прогностическим фактором. Таким образом, высокий уровень экспрессии гена *PRAME* может быть превращён в незначительный фактор.

Наконец, ещё один способ таргетной терапии против *PRAME* заключается в применении анти-*PRAME* антител и их производных, в том числе выполненных в формате блинатумомаб или включённых в состав CAR-рецептора для цитотоксических клеток. Воздействие антител и их производных может иметь эффект по причине наличия белка *PRAME* на поверхности клетки. Наше предположение подтвердилось в экспериментах на иммунодефицитных мышях с привитой *PRAME*-гиперэкспрессирующей опухолью человека mel P. Антитела 5D3

и 6Н8, введённые внутривенно, статистически значимо замедлили рост ксенографтов по сравнению с группой мышей, получивших введение PBS. Наблюдаемый эффект антител может быть усилен путём различных модификаций их структуры.

Возвращаясь к вопросу об иммуноредактировании, поднятому ещё в начале нашего исследования, мы можем привести точно такой же ответ – это не является проблемой и не должно ограничивать внедрение методов анти-PRAME терапии. Основываясь на полученных нами результатах, можно разрабатывать новые линии терапии, которые могут превратить активность *PRAME* из неблагоприятного фактора в потенциально благоприятный при онкологических заболеваниях и гемобластозах.

Чем больше будет создано и апробировано лекарственных препаратов, и чем лучше будут разработаны критерии их применения, тем больше больных онкологическими заболеваниями сможет получить необходимую помощь.

## ВЫВОДЫ

1. Ген *PRAME* при трансфекции в нормальную клетку WI-38 удваивает её скорость пролиферации ( $p=0,0304$ ), придаёт способность к росту в бессывороточной среде ( $p<0,00001$ ), к субстрат-независимому росту ( $p=0,00002$ ), а также к резистентности к химиопрепаратам цисплатину, цитарабину, доксорубицину, мелфалану, циклофосфамиду и бортезомибу ( $p<0,02$  для каждого из химиопрепаратов), что доказывает его драйверные свойства.

2. Высокий уровень экспрессии *PRAME* коррелирует с ухудшением безрецидивной и общей выживаемости при ряде онкологических и онкогематологических заболеваний, имеющих различный гистогенез, что подтверждает драйверные свойства данного белка.

3. Значимым регулятором экспрессии гена *PRAME* является белок RNF8.

4. Нокаут RNF8 в клетках меланомы A875 при помощи антисенс-олигонуклеотидов снижал количество мРНК *PRAME* и увеличивал чувствительность этих клеток к цисплатину ( $p=0,0031$ ).

5. Бортезомиб – высокоселективный обратимый ингибитор активности протеасомы 26S увеличивает чувствительность *PRAME*-экспрессирующих опухолевых клеток к химиопрепаратам цисплатину, цитарабину, доксорубицину, мелфалану и циклофосфамиду, что позволяет рекомендовать данные комбинации препаратов для терапии больных.

6. Химерные анти-*PRAME* антитела 6H8 способны тормозить рост *PRAME*-экспрессирующих ксенографтов у иммунодефицитных мышей и могут рассматриваться как перспективный таргетный противоопухолевый препарат.



## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АИТЛ – ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома  
АКПЖ – аденокарцинома поджелудочной железы  
АКР – адренокортикальный рак  
АКШМ – плоскоклеточный рак шейки матки и эндоцервикальная аденокарцинома  
АЛ – аденокарцинома легкого  
ао – аминокислотный остаток  
АПК – антиген-презентирующая клетка  
БК – бластный криз  
БГЛ – Т-клеточный лейкоз из больших гранулярных лимфоцитов  
борт – бортезомиб  
винк – винкристин  
ГСК – гемопоэтическая стволовая клетка  
ГГМ – глиома головного мозга  
ГЦК – гепатоцеллюлярная карцинома  
ДБКЛ – диффузная В-крупноклеточная лимфома  
ДК – дендритная клетка  
докс – доксорубицин  
ИГХ – иммуногистохимическое окрашивание  
ИЛ – интерлейкин  
ИТК – ингибитор тирозинкиназ  
кДНК – комплементарная ДНК  
КИ – клиническое исследование  
КМ – карциносаркома матки  
КР – колоректальный рак  
мБ – мегабаза  
МГ – мультиформная глиобластома  
МДС – миелодиспластический синдром  
мелф – мелфалан  
миР – микроРНК

МК – меланома кожи  
мкг – микрограмм  
мкл – микролитр  
мл – миллилитр  
мм – миллимоль  
ММ – множественная миелома  
МП – мезотелиома плевры  
нг – нанограмм  
ОЗК – опухоли зародышевых клеток  
ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз  
ОМЛ – острый миелоидный лейкоз  
ОПЛ – острый промиелоцитарный лейкоз  
ПМ – павшие мышцы  
ПРГШ – плоскоклеточный рак головы и шеи  
ПРЛ – плоскоклеточный рак легкого  
ПРП – папиллярный рак почки  
ПТЛН – периферическая Т-клеточная лимфома неспецифицированная  
РЖ – рак желудка  
РК – ретиноевая кислота  
РМЖ – рак молочной железы  
РМП – рак мочевого пузыря  
РП – рак пищевода  
РПЖ – рак предстательной железы  
РТГ – раково-тестикулярные гены  
РТК – рак толстой кишки  
РЦЖ – рак щитовидной железы  
РЭ – рак эндометрия  
СККП – светлоклеточная карцинома почек  
СМТ – саркомы мягких тканей  
СОО – средний объем опухоли

СЦАК – серозная цистаденокарцинома яичника

сут – сутки

Т – тимома

ТРО – эффективность торможения роста опухоли

УМ – увеальная меланома

ФА – фаза акселерации

ФЛ – фолликулярная лимфома

ХК – холангиокарцинома

ХМЛ – хронический миелоидный лейкоз

ХРП – хромофобный рак почки

ХФ – хроническая фаза

цикл – циклофосфамид

цисп – цисплатин

цит – цитарабин

ч – час

В-ХЛЛ – В-клеточный хронический лимфоидный лейкоз

IC50 – концентрация полумаксимального ингибирования

NLS – сигнал ядерной локализации

PBS – натрий-фосфатный буфер

PRAME – Preferentially Expressed Antigen of Melanoma, антиген, предпочтительно экспрессирующийся в меланоме

TCGA – The Cancer Genome Atlas

TLR – толл-подобный рецептор

Treg – Т-регуляторные клетки

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Liang, H. Whole-exome sequencing combined with functional genomics reveals novel candidate driver cancer genes in endometrial cancer /H. Liang, L. W. T. Cheung, J. Li et al// *Genome Res.* – 2012. – Vol. 22, № 11. – P. 2120-2129.
2. Ozdemir, F. Methylation of selected tumor-suppressor genes in benign and malignant ovarian tumors /F. Ozdemir, J. Altinisik, A. Karateke et al// *Exp Ther Med.* – 2012. – Vol. 4, № 6. – P. 1092–1096.
3. Xiong, J. Tumor-suppressive microRNA-22 inhibits the transcription of E-box-containing c-Myc target genes by silencing c-Myc binding protein /J. Xiong, Q. Du, Z. Liang// *Oncogene.* – 2010. – Vol. 29, № 35. – P. 4980-8.
4. Pitolli, C. Do Mutations Turn p53 into an Oncogene? /C. Pitolli, Y. Wang, M. Mancini et al// *Int J Mol Sci.* – 2019. – Vol. 20, № 24. – P. 6241.
5. Xu, J.-M. KRAS mutations in tumor tissue and plasma by different assays predict survival of patients with metastatic colorectal cancer /J.-M. Xu, X.-J. Liu, F.-J. Ge et al// *J Exp Clin Cancer Res.* – 2014. – Vol. 33, № 1. – P. 104.
6. Reitman, Z. J. Promoting a new brain tumor mutation: TERT promoter mutations in CNS tumors /Z. J. Reitman, C. J. Pirozzi, H. Yan// *Acta Neuropathol.* – 2013. – Vol. 126, № 6. – P. 789-92.
7. Fredriksson, N. J. Systematic analysis of noncoding somatic mutations and gene expression alterations across 14 tumor types /N. J. Fredriksson, L. Ny, J. A. Nilsson, E. Larsson// *Nat Genet.* – 2014. – Vol. 46, № 12. – P. 1258-63.
8. Yan, H. Knockdown of PRAME enhances adriamycin-induced apoptosis in chronic myeloid leukemia cells /H. Yan, R.-M. Zhao, Z.-J. Wang et al// *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* – 2015. – Vol. 19, № 24. – P. 4827-34.
9. Costessi, A. The tumour antigen PRAME is a subunit of a Cul2 ubiquitin ligase and associates with active NFY promoters /A. Costessi, N. Mahrour, E. Tijchon et al// *EMBO J.* – 2011. – Vol. 30, № 18. – P. 3786-98.
10. Carvalho, D. D. De BCR-ABL-mediated upregulation of PRAME is responsible for knocking down TRAIL in CML patients /D. D. De Carvalho, R. Binato, W. O. Pereira et al// *Nature.* – 2010. – Vol. 30. – P. 223-233.

11. Tanaka, N. Inhibition of PRAME expression causes cell cycle arrest and apoptosis in leukemic cells /N. Tanaka, Y.-H. Wang, M. Shiseki et al// *Leuk Res.* – 2011. – Vol. 35, № 9. – P. 1219-25.
12. Zhu, H. Downregulation of PRAME suppresses proliferation and promotes apoptosis in hepatocellular carcinoma through the activation of P53 mediated pathway /H. Zhu, J. Wang, J. Yin et al// *Cell Physiol Biochem.* – 2018. – Vol. 45, № 3. – P. 1121-1135.
13. Pierron, A. PGJ2 restores RA sensitivity in melanoma cells by decreasing PRAME and EZH2 /A. Pierron, E. L. Pape, H. Montaudie et al// *J Dermatol Sci.* – 2014. – Vol. 73, № 3. – P. 258-61.
14. Watari, K. Identification of a melanoma antigen, PRAME, as a BCR/ABL-inducible gene /K. Watari, A. Tojo, T. Nagamura-Inoue et al// *FEBS Letters.* – 2000. – Vol. 466, № 2-3. – P. 367-71.
15. Oehler, V. G. The preferentially expressed antigen in melanoma (PRAME) inhibits myeloid differentiation in normal hematopoietic and leukemic progenitor cells /V. G. Oehler, K. A. Guthrie, C. L. Cummings et al// *Blood.* – 2009. – Vol. 114, № 15. – P. 3299-308.
16. Pas, T. De Vaccines in non-small cell lung cancer: rationale, combination strategies and update on clinical trials /T. De Pas, M. Giovannini, M. Rescigno et al// *Crit Rev Oncol Hematol.* – 2012. – Vol. 83, № 3. – P. 432-43.
17. Pan, S.-H. Gene expression of MAGE-A3 and PRAME tumor antigens and EGFR mutational status in Taiwanese non-small cell lung cancer patients /S.-H. Pan, K.-Y. Su, B. Spiessens et al// *Asia Pac J Clin Oncol.* – 2017. – Vol. 13, № 5. – P. e212-e223.
18. Gudas, L. J. Retinoids regulate stem cell differentiation /L. J. Gudas, J. A. Wagner// *J Cell Physiol.* – 2011. – Vol. 226, № 2. – P. 322-30.
19. Bullinger, L. PRAME-induced inhibition of retinoic acid receptor signaling-mediated differentiation—a possible target for ATRA response in AML without t(15;17) /L. Bullinger, R. F. Schlenk, M. Gotz et al// *Clin Cancer Res.* – 2013. – Vol. 19, № 9. – P. 2562-71.

20. Epping, M. T. A functional genetic screen identifies retinoic acid signaling as a target of histone deacetylase inhibitors /M. T. Epping, L. Wang, J. A. Plumb et al// Proc Natl Acad Sci U S A. – 2007. – Vol. 104, № 45. – P. 17777–17782.
21. Liu, Y.-Y. Yeast KEOPS complex regulates telomere length independently of its t6A modification function /Y.-Y. Liu, M.-H. He, J.-C. Liu et al// J Genet Genomics. – 2018. – Vol. 45, № 5. – P. 247-257.
22. Coussens, L. M. Inflammation and cancer /L. M. Coussens, Z. Werb// Nature. – 2002. – Vol. 420, № 6917. – P. 860-867.
23. Munn, L. Cancer-related inflammation /L. Munn// Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med. – 2018. – Vol. 9, № 2. – P. 1370.
24. Saldanha-Araujo, F. Cancer/testis antigen expression on mesenchymal stem cells isolated from different tissues /F. Saldanha-Araujo, R. Haddad, D. L. Zanette et al// Anticancer Res. – 2010. – Vol. 30, № 12. – P. 5023-7.
25. Al-Khadairi, G. PRAME promotes epithelial-to-mesenchymal transition in triple negative breast cancer /G. Al-Khadairi, A. Naik, R. Thomas et al// J Transl Med. – 2019. – Vol. 17, № 1. – P. 9.
26. Plones, T. Turning back the wheel: inducing mesenchymal to epithelial transition via Wilms tumor 1 knockdown in human mesothelioma cell lines to influence proliferation, invasiveness, and chemotaxis /T. Plones, M. Fischer, K. Hohne et al// Pathol Oncol Res. – 2017. – Vol. 23, № 4. – P. 723-730.
27. Nettersheim, D. The cancer/testis-antigen PRAME supports the pluripotency network and represses somatic and germ cell differentiation programs in seminomas /D. Nettersheim, I. Arndt, R. Sharma et al// Br J Cancer. – 2016. – Vol. 115, № 4. – P. 454-464.
28. Roszik, J. Overexpressed PRAME is a potential immunotherapy target in sarcoma subtypes /J. Roszik, W.-L. Wang, J. A. Livingston et al// Clin Sarcoma Res. – 2017. – Vol. 7. – P. 11.
29. Costessi, A. The human EKC/KEOPS complex is recruited to cullin2 ubiquitin ligases by the human tumour antigen PRAME /A. Costessi, N. Mahrour, V. Sharma et al// PLoS One. – 2012. – Vol. 7, № 8. – P. e42822.

30. Radich, J. P. Gene expression changes associated with progression and response in chronic myeloid leukemia /J. P. Radich, H. Dai, M. Mao et al// Proc Natl Acad Sci U S A. – 2006. – Vol. 103, № 8. – P. 2794-9.
31. Мисюрин, В. А. Теория и практика иммунотерапии, направленной против антигена PRAME /В. А. Мисюрин// Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2018. – Т. 11, № 2. – С. 138-49.
32. Ikeda, H. Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor /H. Ikeda 1, B. Lethe, F. Lehmann et al// Immunity. – 1997. – Vol. 6, № 2. – P. 199-208.
33. Wadelin, F. R. PRAME is a golgi-targeted protein that associates with the elongin BC complex and is upregulated by interferon-gamma and bacterial PAMPs /F. R. Wadelin, J. Fulton, H. M. Collins et al// PLoS One. – 2013. – Vol. 8, № 2. – P. e58052.
34. Greiner, J. Simultaneous expression of different immunogenic antigens in acute myeloid leukemia /J. Greiner, M. Ringhoffer, O. Simikopinko et al// Exp Hematol. – 2000. – Vol. 28, № 12. – P. 1413-1422.
35. Yao, J. Tumor subtype-specific cancer-testis antigens as potential biomarkers and immunotherapeutic targets for cancers /J. Yao, O. L. Caballero, W. K. Alfred Yung et al// Cancer Immunol Res . – 2014. – Vol. 2, № 4. – P. 371-9.
36. Dyrskjot, L. Expression of MAGE-A3, NY-ESO-1, LAGE-1 and PRAME in urothelial carcinoma /L. Dyrskjot, K. Zieger, T. K. Lildal, et al// Br J Cancer. – 2012. – Vol. 107, № 1. – P. 116-122.
37. Sigalotti, L. Intratumor heterogeneity of cancer/testis antigens expression in human cutaneous melanoma is methylation-regulated and functionally reverted by 5-aza-2-deoxycytidine /L. Sigalotti, E. Fratta, S. Coral et al// Cancer Res. – 2004. – Vol. 64, № 24. – P. 9167-71.
38. Schenk, T. Hypomethylation of PRAME is responsible for its aberrant overexpression in human malignancies /T. Schenk, S. Stengel, S. Goellner et al// Genes Chromosomes Cancer. – 2007. – Vol. 46, № 9. – P. 796-804.

39. Yao, Y. Increased PRAME-specific CTL killing of acute myeloid leukemia cells by either a novel histone deacetylase inhibitor chidamide alone or combined treatment with decitabine /Y. Yao, J. Zhou, L. Wang et al// PLoS One. – 2013. – Vol. 8, № 8. – P. e70522.
40. Zhang, W. PRAME expression and promoter hypomethylation in epithelial ovarian cancer /W. Zhang, C. J. Barger, K. H. Eng et al// Oncotarget. – 2016. – Vol. 29, № 7. – P. 45352-45369.
41. Jeong, Y. J. Methylation of the RELA gene is associated with expression of NF- $\kappa$ B1 in response to TNF- $\alpha$  in breast cancer /Y. J. Jeong, H. K. Oh, H. R. Choi// Molecules. – 2019. – Vol. 24, № 15. – P. 2834.
42. Srivastava, C. NF $\kappa$ B is a critical transcriptional regulator of atypical cadherin FAT1 in glioma /C. Srivastava, K. Irshad, Y. Gupta et al// BMC Cancer. – 2020. – Vol. 20. – P. 62.
43. Han, S.-H. Reduced microRNA 375 in colorectal cancer upregulates metadherin-mediated signaling /S.-H. Han, J.-S. Mo, W.-C. Park et al// World J Gastroenterol. – 2019. – Vol. 25, № 44. – P. 6495–6507.
44. Xu, J. E3 ubiquitin ligase CHIP attenuates cellular proliferation and invasion abilities in triple-negative breast cancer cells /J. Xu, H. Wang, W. Li et al// Clin Exp Med. – 2020. – Vol. 20, № 1. – P. 109-119.
45. Xu, J. Transcriptomic analysis associated with reversal of cisplatin sensitivity in drug resistant osteosarcoma cells after a drug holiday /J. Xu, H. Wang, W. Li et al// Clin Exp Med. – 2020. – Vol. 20, № 1. – P. 109-119.
46. Sun, Q. Small GTPase RHOE/RND3, a new critical regulator of NF- $\kappa$ B signalling in glioblastoma multiforme? /Q. Sun, H. Dong, Y. Li et al// Cell proliferation. – 2019. – Vol. 52, № 5. – P. 12665.
47. Liu, A. Estrogen receptor alpha activates MAPK signaling pathway to promote the development of endometrial cancer /A. Liu, D. Zhang, X. Yang et al// J Cell Biochem. – 2019. – Vol. 120, № 10. – P. 17593-17601.



48. Oberthuer, A. The tumor-associated antigen PRAME is universally expressed in high-stage neuroblastoma and associated with poor outcome /A. Oberthuer, B. Hero, R. Spitz et al// Clin Cancer Res. – 2004. – Vol. 10, № 13. – P. 4307-13.
49. Soikkeli, J. Systematic search for the best gene expression markers for melanoma micrometastasis detection /J. Soikkeli, M. Lukk, P. Nummela et al// J Pathol. – 2007. – Vol. 213, № 2. – P. 180-9.
50. Yao, Z. Analytical characteristics of a noninvasive gene expression assay for pigmented skin lesions /Z. Yao, T. Allen, M. Oakley et al// Assay Drug Dev Technol. – 2016. – Vol. 14, № 6. – P. 355-63.
51. Gerami, P. Development and validation of a noninvasive 2-gene molecular assay for cutaneous melanoma /P. Gerami, Z. Yao, D. Polsky et al// J Am Acad Dermatol. – 2017. – Vol. 76, № 1. – P. 114-120.
52. Brenne, K. PRAME (preferentially expressed antigen of melanoma) is a novel marker for differentiating serous carcinoma from malignant mesothelioma /K. Brenne, D. A. Nymoene, R. Reich et al// American Journal of Clinical Pathology. – 2012. – Vol. 137, № 2. – P. 240-247.
53. Field, M. G. PRAME as an independent biomarker for metastasis in uveal melanoma /M. G. Field, C. L. Decatur, S. Kurtenbach et al// Clin Cancer Res. – 2016. – Vol. 22, № 5. – P. 1234-1242.
54. Beard, R. E. Gene expression profiling using nanostring digital RNA counting to identify potential target antigens for melanoma immunotherapy /R. E. Beard, D. Abate-Daga, S. F. Rosati et al// Clin Cancer Res. – 2013. – Vol. 19, № 18. – P. 4941–4950.
55. Gutzmer, R. Safety and immunogenicity of the PRAME cancer immunotherapeutic in metastatic melanoma: results of a phase I dose escalation study /R. Gutzmer, L. Rivoltini, E. Levchenko et al// ESMO Open. – 2016. – Vol. 1, № 4. – P. e000068.
56. Westekemper, H. Expression of MCSP and PRAME in conjunctival melanoma /H. Westekemper, S. Karimi, D. Susskind et al// Br J Ophthalmol. – 2010. – Vol. 94, № 10. – P. 1322-7.

57. Field, M. G. Epigenetic reprogramming and aberrant expression of PRAME are associated with increased metastatic risk in Class 1 and Class 2 uveal melanomas /M. G. Field, M. A. Durante, C. L. Decatur et al// *Oncotarget*. – 2016. – Vol. 7, № 37. – P. 59209-59219.
58. Nalini, V. Molecular insights on post-chemotherapy retinoblastoma by microarray gene expression analysis /V. Nalini, R. Segu, P. R. Deepa et al// *Bioinform Biol Insights*. – 2013. – Vol. 7. – P. 289–306.
59. Toledo, S. R. C. Insights on PRAME and osteosarcoma by means of gene expression profiling /S. R. C. Toledo, M. A. Zago, I. D. Oliveira et al// *J Orthop Sci*. – 2011. – Vol. 16, № 4. – P. 458-66.
60. Zou, C. Cancer-testis antigens expressed in osteosarcoma identified by gene microarray correlate with a poor patient prognosis /C. Zou, J. Shen, Q. Tang, et al// *Cancer*. – 2012. – Vol. 118, № 7. – P. 1845-55.
61. Tan, P. Expression and prognostic relevance of PRAME in primary osteosarcoma /P. Tan, C. Zou, B. Yong et al// *Biochem Biophys Res Commun*. – 2012. – Vol. 419, № 4. – P. 801-8.
62. Li, C.-M. Gene expression in Wilms' tumor mimics the earliest committed stage in the metanephric mesenchymal-epithelial transition /C.-M. Li, M. Guo, A. Borczuk et al// *Am J Pathol*. – 2002. – Vol. 160, № 6. – P. 2181–2190.
63. Hemminger, J. A. Expression of cancer-testis antigens MAGEA1, MAGEA3, ACRBP, PRAME, SSX2, and CTAG2 in myxoid and round cell liposarcoma /J. A. Hemminger, A. E. Toland, T. J. Scharschmidt et al// *Modern Pathology*. – 2014. – Vol. 27. – P. 1238-1245.
64. Iura, K. Cancer-testis antigens PRAME and NY-ESO-1 correlate with tumour grade and poor prognosis in myxoid liposarcoma /K. Iura, K. Kohashi, Y. Hotokebuchi et al// *J Pathol Clin Res*. – 2015. – Vol. 1, № 3. – P. 144–159.
65. Neumann, E. Heterogeneous expression of the tumor-associated antigens RAGE-1, PRAME, and glycoprotein 75 in human renal cell carcinoma: candidates for T-cell-based immunotherapies? /E. Neumann, A. Engelsberg, J. Decker et al// *Cancer Res*. – 1998. – Vol. 58, № 18. – P. 4090-5.

66. Dannenmann, S. Spontaneous peripheral T-cell responses toward the tumor-associated antigen cyclin D1 in patients with clear cell renal cell carcinoma /S. Dannenmann, T. Hermanns, A. Bransi et al// *Cancer Immunology Research*. – 2013. – Vol. 1, № 5. – P. 288-95.
67. Ringhoffer, M. Simultaneous expression of T-cell activating antigens in renal cell carcinoma: implications for specific immunotherapy /M. Ringhoffer, C. R. Muller, A. Schenk et al// *J Urol*. – 2004. – Vol. 171, № 6. – P. 2456-60.
68. Choudhury, Y. A multigene assay identifying distinct prognostic subtypes of clear cell renal cell carcinoma with differential response to tyrosine kinase inhibition /Y. Choudhury, X. Wei, Y.-H. Chu et al// *Eur Urol*. – 2015. – Vol. 67, № 1. – P. 17-20.
69. Boon, K. Comparison of medulloblastoma and normal neural transcriptomes identifies a restricted set of activated genes /K. Boon, J. B. Edwards, I.-M. Siu et al// *Oncogene*. – 2003. – Vol. 22. – P. 7687-7694.
70. Vulcani-Freitas, T. M. PRAME gene expression profile in medulloblastoma /T. M. Vulcani-Freitas, N. Saba-Silva, A. Cappellano et al// *Arq Neuropsiquiatr*. – 2011. – Vol. 69, № 1. – P. 9-12.
71. Fevre-Montange, M. Microarray analysis reveals differential gene expression patterns in tumors of the pineal region /M. Fevre-Montange, Jacques Champier, Alexandru Szathmari et al// *J Neuropathol Exp Neurol*. – 2006. – Vol. 65, № 7. – P. 675-84.
72. Lerut, E. Rates of MAGE-A3 and PRAME expressing tumors in FFPE tissue specimens from bladder cancer patients: potential targets for antigen-specific cancer immunotherapeutics /E. Lerut, H. Van Poppel, S. Joniau et al// *Int J Clin Exp Pathol*. – 2015. – Vol. 8, № 8. – P. 9522-32.
73. Figueiredo, D. L. A. Expression of cancer testis antigens in head and neck squamous cell carcinomas /D. L. A. Figueiredo, R. C. M. Mamede, R. Proto-Siqueira et al// *Head Neck*. – 2006. – Vol. 28, № 7. – P. 614-9.

74. Cuffel, C. Pattern and clinical significance of cancer-testis gene expression in head and neck squamous cell carcinoma /C. Cuffel, J.-P. Rivals, Y. Zaugg et al// International Journal of Cancer. – 2011. – Vol. 128, № 11. – P. 2625-34.
75. Szczepanski, M. J. PRAME expression in head and neck cancer correlates with markers of poor prognosis and might help in selecting candidates for retinoid chemoprevention in pre-malignant lesions /M. J. Szczepanski, A. B. DeLeo, M. Luczak et al// Oral Oncol. – 2013. – Vol. 49, № 2. – P. 144-51.
76. Thongprasert, S. The prevalence of expression of MAGE-A3 and PRAME tumor antigens in East and South East Asian non-small cell lung cancer patients /S. Thongprasert, P.-C. Yang, J. S. Lee et al// Lung Cancer. – 2016. – Vol. 101 . – P. 137-144.
77. Huang, Q. Identification of preferentially expressed antigen of melanoma as a potential tumor suppressor in lung adenocarcinoma /Q. Huang, L. Li, Z. Lin et al// Med Sci Monit. – 2016. – Vol. 22, № . – P. 1837-42.
78. Huang, Q. Preferentially expressed antigen of melanoma prevents lung cancer metastasis /Q. Huang, H. Wei, Z. Wu et al// PLoS One. – 2016. – Vol. 11, № 7. – P. e0149640.
79. Bankovic, J. Identification of genes associated with non-small-cell lung cancer promotion and progression /J. Bankovic, J. Stojsic, D. Jovanovic et al// Lung Cancer. – 2010. – Vol. 67, № 2. – P. 151-9.
80. Doolan, P. Prevalence and prognostic and predictive relevance of PRAME in breast cancer /P. Doolan, M. Clynes, S. Kennedy et al// Breast Cancer Res Treat. – 2008. – Vol. 109, № 2. – P. 359-65.
81. Epping, M. T. PRAME expression and clinical outcome of breast cancer /M. T. Epping, A. A. M. Hart, A. M. Glas et al// Br J Cancer. – 2008. – Vol. 99, № 3. – P. 398–403.
82. Sun, Y. Derivation of molecular signatures for breast cancer recurrence prediction using a two-way validation approach /Y. Sun, V. Urquidi, G. Steve et al// Breast Cancer Res Treat. – 2010. – Vol. 119, № 3. – P. 593-599.

83. Sun, Z. PRAME is critical for breast cancer growth and metastasis /Z. Sun, Z. Wu, F. Zhang et al// Gene. – 2016. – Vol. 594, № 1. – P. 160-164.
84. Tan, W. J. A five-gene reverse transcription-PCR assay for pre-operative classification of breast fibroepithelial lesions /W. J. Tan, I. Cima, Y. Choudhury et al// Breast Cancer Res. – 2016. – Vol. 18, № 1. – P. 31.
85. Мисюрин, В. А. X-хромосомные раково-тестикулярные гены /В. А. Мисюрин// Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 2. – С. 3-9.
86. Мисюрин, В. А. Аутосомные раково-тестикулярные гены /В. А. Мисюрин// Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 77-82.
87. Birtle, Z. Duplication and positive selection among hominin-specific PRAME genes /Z. Birtle, L. Goodstadt, C. Ponting et al// BMC Genomics. – 2005. – Vol. 6. – P. 120.
88. Epping, M. T. The human tumor antigen PRAME is a dominant repressor of retinoic acid receptor signaling /M. T. Epping, L. Wang, M. J. Edel et al// Cell. – 2005. – Vol. 122, № 6. – P. 835-47.
89. Graf, U. Prame17 mediates ground-state pluripotency through proteasomal-epigenetic combined pathways /U. Graf, E. A. Casanova, S. Wyck et al// Nat Cell Biol. – 2017. – Vol. 19, № 7. – P. 763-773.
90. Cao, R. Role of Bmi-1 and Ring1A in H2A ubiquitylation and Hox gene silencing /R. Cao, Y.-I. Tsukada, Y. Zhang et al// Mol Cell. – 2005. – Vol. 20, № 6. – P. 845-54.
91. Partheen, K. Four potential biomarkers as prognostic factors in stage III serous ovarian adenocarcinomas /K. Partheen, K. Levan, L. Osterberg, et al// Int J Cancer. – 2008. – Vol. 123, № 9. – P. 2130-7.
92. Orlando, D. Adoptive immunotherapy using PRAME-specific T cells in medulloblastoma /D. Orlando, E. Miele, B. De Angelis et al// Cancer Res. – 2018. – Vol. 78, № 12. – P. 3337-3349.

93. Tian, W. Combined analysis of DNA methylation and gene expression profiles of osteosarcoma identified several prognosis signatures /W. Tian, Y. Li, J. Zhang et al// Gene. – 2018. – Vol. 650. – P. 7-14.
94. Epping, M. T. A causal role for the human tumor antigen preferentially expressed antigen of melanoma in cancer /M. T. Epping, R. Bernards// Cancer Res. – 2006. – Vol. 66, № 22. – P. 10639-42.
95. Копнин, Б. П. Современные представления о механизмах злокачественного роста: сходства и различия солидных опухолей и лейкозов /Б. П. Копнин// Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. 2012. С. – . – Т. 5, № 3. – С. 165-185.
96. Hanahan, D. Hallmarks of cancer: the next generation /D. Hanahan, R. A. Weinberg// Cell. – 2011. – Vol. 144, № 5. – P. 646-674.
97. Biermann, K. Genome-wide expression profiling reveals new insights into pathogenesis and progression of testicular germ cell tumors /K. Biermann, L. C. Heukamp, K. Steger et al// Cancer Genomics Proteomics. – 2007. – Vol. 4, № 5. – P. 359-67.
98. Kloudova, K. Expression of tumor antigens on primary ovarian cancer cells compared to established ovarian cancer cell lines /K. Kloudova, H. Hromadkova, S. Partlova et al// Oncotarget. – 2016. – Vol. 7, № 29. – P. 46120-46126.
99. Partheen, K. Expression analysis of stage III serous ovarian adenocarcinoma distinguishes a sub-group of survivors /K. Partheen, K. Levan, L. Osterberg et al// Eur J Cancer. – 2006. – Vol. 42, № 116. – P. 2846-54.
100. Partheen, K. External validation suggests Integrin beta 3 as prognostic biomarker in serous ovarian adenocarcinomas /K. Partheen, K. Levan, L. Osterberg et al// BMC Cancer. – 2009. – Vol. 23, № 9. – P. 336.
101. van Baren, N. Genes encoding tumor-specific antigens are expressed in human myeloma cells /N. van Baren, F. Brasseur, D. Godelaine et al// Blood. – 1999. – Vol. 94, № 4. – P. 1156-1164.
102. Pellat-Deceunynck, C. The cancer germ-line genes MAGE-1, MAGE-3 and PRAME are commonly expressed by human myeloma cells /C. Pellat-

- Deceunynck, M. P. Mellerin, N. Labarriere et al// *Eur J Immunol.* – 2000. – Vol. 30, № 3. – P. 803-9.
103. Andrade, V. C. C. Prognostic impact of cancer/testis antigen expression in advanced stage multiple myeloma patients /V. C. C. Andrade, A. L. Vettore, R. S. Felix et al// *Cancer Immun.* – 2008. – Vol. 8. – P. 2.
104. Гапонова, Т. В. Экспрессия опухолеассоциированных генов PRAME, WT1 и XIAP у больных множественной миеломой /Т. В. Гапонова, Л. П. Менделеева, А. В. Мисюрин и др// *Онкогематология.* – 2009. – Т. 4, № 2. – С. 52-57.
105. Qin, Y. Bortezomib improves progression-free survival in multiple myeloma patients overexpressing preferentially expressed antigen of melanoma /Y. Qin, J. Lu, L. Bao et al// *Chin Med J (Engl).* – 2014. – Vol. 127, № 9. – P. 1666-71.
106. Абраменко, И. В. Экспрессия гена PRAME при множественной миеломе /И. В. Абраменко, Н. И. Белоус, И. А. Крячок и др// *Терапевтический архив.* – 2004. – Т. 76, № 7. – С. 77-81.
107. Luetkens, T. Functional autoantibodies against SSX-2 and NY-ESO-1 in multiple myeloma patients after allogeneic stem cell transplantation /T. Luetkens, S. Kobold, Y. Cao et al// *Cancer Immunol Immunother.* – 2014. – Vol. 63, № 11. – P. 1151-62.
108. Paydas, S. PRAME mRNA levels in cases with chronic leukemia: Clinical importance and review of the literature /S. Paydas, K. Tanriverdi, S. Yavuz, G. Seydaoglu et al// *Leuk Res.* – 2007. – Vol. 31, № 3. – P. 365-9.
109. Gunn, S. R. Array CGH analysis of chronic lymphocytic leukemia reveals frequent cryptic monoallelic and biallelic deletions of chromosome 22q11 that include the PRAME gene /S. R. Gunn, A. R. Bolla, L. L. Barron et al// *Leuk Res.* – 2009. – Vol. 33, № 9. – P. 1276-81.
110. Mraz, M. The origin of deletion 22q11 in chronic lymphocytic leukemia is related to the rearrangement of immunoglobulin lambda light chain locus /M. Mraz, K. S. Kozubik, K. Plevova et al// *Leuk Res.* – 2013. – Vol. 37, № 7. – P. 802-8.

111. Захаров, С. Г. Уровень экспрессии генов апоптоза FAS, TNFR2, TRAIL, DR3, DR4/5 у больных с впервые выявленным хроническим лимфолейкозом до и после проведения терапии флударабином, циклофосфамидом и ритуксимабом (FCR) /С. Г. Захаров, А. К. Голенков, В. А. Мисюрин и др// Альманах клинической медицины. – 2018. – Т. 46, № 8. – С. 734-741.
112. Arons, E. PRAME expression in hairy cell leukemia /E. Arons, T. Suntum, I. Margulies et al// Leuk Res. – 2008. – Vol. 32, № 9. – P. 1400-6.
113. Staege, M. S. Gene expression profiles of Hodgkin's lymphoma cell lines with different sensitivity to cytotoxic drugs /M. S. Staege, U. Banning-Eichenseer, G. Weissflog et al// Exp Hematol. – 2008. – Vol. 36, № 7. – P. 886-96.
114. Kewitz, S. Knock-down of PRAME increases retinoic acid signaling and cytotoxic drug sensitivity of hodgkin lymphoma cells /S. Kewitz, M. S. Staege// PLoS One. – 2013. – Vol. 8, № 2. – P. e55897.
115. Ercolak, V. PRAME expression and its clinical relevance in Hodgkin's lymphoma /V. Ercolak, S. Paydas, E. Bagir et al// Acta Haematol. – 2015. – Vol. 134, № 4. – P. 199-207.
116. Kawano, R. Oncogene associated cDNA microarray analysis shows PRAME gene expression is a marker for response to anthracycline containing chemotherapy in patients with diffuse large B-cell lymphoma /R. Kawano, K. Karube, M. Kikuchi et al// J Clin Exp Hematop. – 2009. – Vol. 49, № 1. – P. 1-7.
117. Prognostic significance of PRAME expression based on immunohistochemistry for diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP therapy /et al// . – . – Vol. , № . – P. .
118. Mitsuhashi, K. The expression of PRAME in chronic lymphoproliferative disorders /K. Mitsuhashi, A. Masuda, Y.-H. Wang et al// Int J Hematol. – 2014. – Vol. 100, № 1. – P. 88-95.
119. Мисюрин, В. А. Лукина Особенности соотношения уровней экспрессии генов PRAME и PML/RAR $\alpha$  в дебюте острого промиелоцитарного лейкоза /В. А. Мисюрин, А. Е. Лукина, А. В. Мисюрин и др// Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 9-16.



120. Bea, S. Uniparental disomies, homozygous deletions, amplifications, and target genes in mantle cell lymphoma revealed by integrative high-resolution whole-genome profiling /S. Bea, I. Salaverria, L. Armengol et al// Blood. – 2009. – Vol. 113, № 13. – P. 3059-69.
121. Liggins, A. P. A panel of cancer-testis genes exhibiting broadspectrum expression in haematological malignancies /A. P. Liggins, S. H. Lim, E. J. Soilleux et al// Cancer Immun. – 2010. – Vol. 10. – P. 8.
122. Мисюрин, В. А. Новые маркеры прогрессирования хронического миелолейкоза /В. А. Мисюрин, А. В. Мисюрин, Л. А. Кесаева и др// Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2014. – Т. 7, № 2. – С. 206-212.
123. Luetkens, T. Expression, epigenetic regulation, and humoral immunogenicity of cancer-testis antigens in chronic myeloid leukemia /T. Luetkens, P. Schafhausen, U. Frederike et al// Leukemia Research. – 2010. – Vol. 34, № 12. – P. 1647-1655.
124. Schmitt, M. Chronic myeloid leukemia cells express tumor-associated antigens eliciting specific CD8+ T-cell responses and are lacking costimulatory molecules /M. Schmitt, L. Li, K. Giannopoulos et al// Exp Hematol. – 2006. – Vol. 34, № 12. – P. 1709-19.
125. Gerber, J. M. Characterization of chronic myeloid leukemia stem cells /J. M. Gerber, L. Qin, J. Kowalski et al// Am J Hematol. – 2011. – Vol. 86, № 1. – P. 31-7.
126. Hughe, A. CML patients with deep molecular responses to TKI have restored immune effectors and decreased PD-1 and immune suppressors /A. Hughe, J. Clarkson, C. Tang et al// Blood. – 2017. – Vol. 129, № 9. – P. 1166-1176.
127. Qian, J. Hypomethylation of PRAME promoter is associated with poor prognosis in myelodysplastic syndrome /J. Qian, Z.-h. Zhu, J. Lin et al// Br J Haematol. – 2011. – Vol. 154, № 1. – P. 153-5.
128. Qin, Y.-Z. PRAME and WT1 transcripts constitute a good molecular marker combination for monitoring minimal residual disease in myelodysplastic

- syndromes /Y.-Z. Qin, H.-H. Zhu, Y.-R. Liu et al// *Leuk Lymphoma*. – 2013. – Vol. 54, № 7. – P. 1442-9.
129. Liberante, F. G. High and low, but not intermediate, PRAME expression levels are poor prognostic markers in myelodysplastic syndrome at disease presentation /F. G. Liberante, A. Pellagatti, V. Boncheva et al// *Br J Haematol*. – 2013. – Vol. 162, № 2. – P. 282-5.
130. Steinbach, D. PRAME gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia /D. Steinbach, S. Viehmann, F. Zintl, B. Gruhn// *Cancer Genet Cytogenet*. – 2002. – Vol. 138, № 1. – P. 89-91.
131. Khateeb, E. E. Preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) and Wilms' Tumor 1 (WT 1) genes expression in childhood acute lymphoblastic leukemia, prognostic role and correlation with survival /E. E. Khateeb, D. Morgan// *Open Access Maced J Med Sci*. – 2015. – Vol. 3, № 1. – P. 57-62.
132. Zhang, Y.-H. PRAME overexpression predicted good outcome in pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia patients receiving chemotherapy /Y.-H. Zhang, A.-D. Lu, L. Yang et al// *Leuk Res*. – 2017. – Vol. 52. – P. 43-49.
133. Steinbach, D. Identification of a set of seven genes for the monitoring of minimal residual disease in pediatric acute myeloid leukemia /D. Steinbach, A. Schramm, A. Eggert et al// *Clinical Cancer Research*. – 2006. – Vol. 12, № 8. – P. 2434-41.
134. Clinical implications of PRAME gene expression in childhood acute myeloid leukemia /et al// . – . – Vol. , № . – P. .
135. Goellner, S. Childhood acute myelogenous leukaemia: Association between PRAME, apoptosis- and MDR-related gene expression /S. Goellner, D. Steinbach, T. Schenk et al// *Eur J Cancer*. – 2006. – Vol. 42, № 16. – P. 2807-14.
136. Tajeddine, N. Tumor associated antigen PRAME is a marker of favorable prognosis in childhood acute myeloid leukemia patients and modifies the expression of S100A4, Hsp 27, p21, IL-8 and IGFBP-2 in vitro and in vivo /N. Tajeddine, M. Louis, C. Vermynen et al// *Leuk Lymphoma*. – 2008. – Vol. 49, № 6. – P. 1123-31.

137. Steinbach, D. Prospective validation of a new method of monitoring minimal residual disease in childhood acute myelogenous leukemia /D. Steinbach, P. Bader, A. Willasch et al// Clin Cancer Res. – 2015. – Vol. 21, № 6. – P. 1353-9.
138. McElwaine, S. Microarray transcript profiling distinguishes the transient from the acute type of megakaryoblastic leukaemia (M7) in Down's syndrome, revealing PRAME as a specific discriminating marker /S. McElwaine, C.Mulligan, J. Groet et al// Br J Haematol. – 2004. – Vol. 125, № 6. – P. 729-42.
139. Matsushita, M. Quantitative monitoring of the PRAME gene for the detection of minimal residual disease in leukaemia /M. Matsushita, H. Ikeda, M. Kizaki et al// Br J Haematol. – 2001. – Vol. 112, № 4. – P. 916-26.
140. Ding, K. PRAME Gene Expression in Acute Leukemia and Its Clinical Significance /K. Ding, X. Wang, R. Fu et al// Cancer Biol Med. – 2012. – Vol. 9, № 1. – P. 73-76.
141. Paydas, S. PRAME mRNA levels in cases with acute leukemia: clinical importance and future prospects /S. Paydas, K. Tanriverdi, S. Yavuz et al// Am J Hematol. – 2005. – Vol. 79, № 4. – P. 257-61.
142. Tajeddine, N. Real-time RT-PCR quantification of PRAME gene expression for monitoring minimal residual disease in acute myeloblastic leukaemia /N. Tajeddine, I. Millard, P. Gailly, J.-L. Gala// Clin Chem Lab Med. – 2006. – Vol. 44, № 5. – P. 548-55.
143. Santamaria, C. The relevance of preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) as a marker of disease activity and prognosis in acute promyelocytic leukemia /C. Santamaria, M. C. Chillon, R. Garcia-Sanz et al// Haematologica. – 2008. – Vol. 93, № 12. – P. 1797-805.
144. Santamaria, C. Molecular stratification model for prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia /C. Santamaria, M. C. Chillon, R. Garcia-Sanz et al// Blood. – 2009. – Vol. 114, № 1. – P. 148-52.
145. Atanackovic, D. Cancer-testis antigen expression and its epigenetic modulation in acute myeloid leukemia /D. Atanackovic, T. Luetkens, B. Kloth et al// Am J Hematol. – 2011. – Vol. 86, № 11. – P. 918-22.

146. Qin, Y. Expression patterns of WT1 and PRAME in acute myeloid leukemia patients and their usefulness for monitoring minimal residual disease /Y. Qin, H. Zhu, B. Jiang et al// *Leuk Res.* – 2009. – Vol. 33, № 3. – P. 384-90.
147. Schneider, V. Leukemic progenitor cells are susceptible to targeting by stimulated cytotoxic T cells against immunogenic leukemia-associated antigens /V. Schneider, L. Zhang, M. Thomas et al// *International Journal of Cancer.* – 2015. – Vol. 137, № 9. – P. 2083–2092.
148. Dendritic cells generated from acute myeloid leukemia (AML) blasts maintain the expression of immunogenic leukemia associated antigens /L. Li, P. Reinhardt, A. Schmitt et al// *Cancer Immunol Immunother.* – 2005. – Vol. 54, № 7. – P. 685-93.
149. Tajeddine, N. Tumor-associated antigen preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) induces caspase-independent cell death in vitro and reduces tumorigenicity in vivo /N. Tajeddine, J.-L. Gala, M. Louis et al// *Cancer Res.* – 2005. – Vol. 65, № 16. – P. 7348-55.
150. Spanaki, A. Quantitative assessment of PRAME expression in diagnosis of childhood acute leukemia /A. Spanaki, C. Perdikogianni, E. Linardakis, M. Kalmanti et al// *Leuk Res.* – 2007. – Vol. 31, № 5. – P. 639-42.
151. Steinbach, D. PRAME expression is not associated with down-regulation of retinoic acid signaling in primary acute myeloid leukemia /D. Steinbach, N. Pfaffendorf, S. Wittig, B. Gruhn et al// *Cancer Genet Cytogenet.* – 2007. – Vol. 177, № 1. – P. 51-4.
152. Xu, Y. PRAME induces apoptosis and inhibits proliferation of leukemic cells in vitro and in vivo /Y. Xu, Q. Yue, H. Wei, G. Pan et al// *Int J Clin Exp Pathol.* – 2015. – Vol. 8, № 11. – P. 14549–14555.
153. Xu, Y. PRAME promotes in vitro leukemia cells death by regulating S100A4/p53 signaling /Y. Xu, L.-J. Rong, S.-L. Meng et al// *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* – 2016. – Vol. 20, № 6. – P. 1057-63.
154. Baren, N. van PRAME, a gene encoding an antigen recognized on a human melanoma by cytolytic T cells, is expressed in acute leukaemia cells /N. van Baren,

- H. Chambost, A. Ferrant et al// Br J Haematol. – 1998. – Vol. 102, № 5. – P. 1376-9.
155. Greiner, J. mRNA expression of leukemia-associated antigens in patients with acute myeloid leukemia for the development of specific immunotherapies /J. Greiner, M. Ringhoffer, M. Taniguchi et al// Int J Cancer. – 2004. – Vol. 108, № 5. – P. 704-11.
156. Epigenetic regulation of PRAME gene in chronic myeloid leukemia /J. Roman-Gomez, A. Jimenez-Velasco, X. Agirre et al// Leuk Res. – 2007. – Vol. 31, № 11. – P. 1521-8.
157. Zhang, W. Correlation between preferentially expressed antigen of melanoma and tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand gene expression in different types of leukaemia patients /W. Zhang, K. Chi, Y. Zhang et al// Acta Haematol. – 2013. – Vol. 130, № 4. – P. 297-304.
158. Ortmann, C. A. Aberrant hypomethylation of the cancer–testis antigen PRAME correlates with PRAME expression in acute myeloid leukemia /C. A. Ortmann, L. Eisele, H. Nuckel et al// Ann Hematol. – 2008. – Vol. 87, № 10. – P. 809-18.
159. Proto-Siqueira, R. PRAME is a membrane and cytoplasmic protein aberrantly expressed in chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma /R. Proto-Siqueira, L. L. Figueiredo-Pontes, R. A. Panepucci et al// Leuk Res. – 2006. – Vol. 30, № 11. – P. 1333-9.
160. Злокачественные новообразования в России в 2015 году, заболеваемость и смертность /А. Д. Каприн, В. В. Старинский, Г. В. Петрова// – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, – 2017. – илл. – 250 с.
161. Babiak, A. Frequent T cell responses against immunogenic targets in lung cancer patients for targeted immunotherapy /A. Babiak, M. Steinhauser, M. Gotz et al// Oncol Rep. – 2014. – Vol. 31, № 1. – P. 384-90.
162. Злокачественные новообразования в России в 2018 году, заболеваемость и смертность /А. Д. Каприн, В. В. Старинский, Г. В. Петрова// – М.: МНИОИ

- им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, – 2019. – илл. – 250 с.
163. Tumor mRNA-transfected dendritic cells stimulate the generation of CTL that recognize neuroblastoma-associated antigens and kill tumor cells: immunotherapeutic implications /et al// . – . – Vol. , № . – P. .
  164. Morandi, F. Common Ewing sarcoma-associated antigens fail to induce natural T cell responses in both patients and healthy individual /F. Morandi, S. Chiesa, P. Bocca et al// Neoplasia. – 2006. – Vol. 8, № 10. – P. 833-42.
  165. Spel, L. Natural killer cells facilitate PRAME-specific T-cell reactivity against neuroblastoma /L. Spel, J.-J. Boelens, D. M. van der Steen et al// Oncotarget. – 2015. – Vol. 6, № 34. – P. 35770–35781.
  166. Kessler, J. H. Efficient identification of novel HLA-A\*0201–presented cytotoxic T lymphocyte epitopes in the widely expressed tumor antigen prame by proteasome-mediated digestion analysis /J. H. Kessler, N. J. Beekman, S. A. Bres-Vloemans et al// J Exp Med. – 2001. – Vol. 193, № 1. – P. 73-88.
  167. Rezvani, K. Ex vivo characterization of polyclonal memory CD8 T-cell responses to PRAME-specific peptides in patients with acute lymphoblastic leukemia and acute and chronic myeloid leukemia /K. Rezvani, A. S. M. Yong, A. Tawab et al// Blood. – 2009. – Vol. 113, № 10. – P. 2245-55.
  168. Quintarelli, C. High-avidity cytotoxic T lymphocytes specific for a new PRAME-derived peptide can target leukemic and leukemic-precursor cells /C. Quintarelli, G. Dotti, S. T. Hasan et al// Blood. – 2011. – Vol. 117, № 12. – P. 3353–3362.
  169. Kessler, J. H. Competition-based cellular peptide binding assays for 13 prevalent hla class i alleles using fluorescein-labeled synthetic peptides hum immunol /J. H. Kessler, B. Mommaas, T. Mutis et al// Hum Immunol. – 2003. – Vol. 64, № 2. – P. 245-55.
  170. Kawahara, M. Identification of HLA class I–restricted tumor-associated antigens in adult T cell leukemia cells by mass spectrometric analysis /M. Kawahara, T. Hori, Y. Matsubara et al// Exp Hematol. – 2006. – Vol. 34, № 11. – P. 1496-504.

171. Kessler, J. H. Antigen processing by nardilysin and thimet oligopeptidase generates cytotoxic T cell epitopes /J. H. Kessler, S. Khan, U. Seifert et al// *Nat Immunol.* – 2011. – Vol. 12, № 1. – P. 45-53.
172. Grunebach, F. BCR-ABL is not an immunodominant antigen in chronic myelogenous leukemia /F. Grunebach, V. Mirakaj, V. Mirakaj et al// *Cancer Res.* – 2006. – Vol. 66, № 11. – P. 5892-900.
173. Greiner, J. Expression of tumor-associated antigens in acute myeloid leukemia: implications for specific immunotherapeutic approaches /J. Greiner, M. Schmitt, L. Li et al// *Blood.* – 2006. – Vol. 108, № 13. – P. 4109-17.
174. Weber, G. Generation of tumor antigen-specific T cell lines from pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia – implications for immunotherapy /G. Weber, I. Caruana, R. H. Rouce et al// *Clin Cancer Res.* – 2013. – Vol. 19, № 18. – P. 5079-91.
175. Yan, M. Increased PRAME antigen-specific killing of malignant cell lines by low avidity CTL clones, following treatment with 5-Aza-2'-Deoxycytidine /M. Yan, N. Himoudi, B. P. Basu et al// *Cancer Immunol Immunother.* – 2011. – Vol. 60, № 9. – P. 1243-55.
176. Pollack, S. M. NYESO-1/LAGE-1s and PRAME are targets for antigen specific T cells in chondrosarcoma following treatment with 5-Aza-2-deoxycytidine /S. M. Pollack, Y. Li, M. J. Blaisdellet al// *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7, № 2. – P. e32165.
177. Zhang, M. T cells derived from human melanoma draining lymph nodes mediate melanoma-specific antitumor responses in vitro and in vivo in human melanoma xenograft model /M. Zhang, H. Graor, A. Visioni et al// *J Immunother.* – 2015. – Vol. 38, № 6. – P. 229-38.
178. Weber, J. S. A phase 1 study of a vaccine targeting preferentially expressed antigen in melanoma and prostate-specific membrane antigen in patients with advanced solid tumors /J. S. Weber, N. J. Vogelzang, M. S. Ernstoff et al// *J Immunother.* – 2011. – Vol. 34, № 7. – P. 556-67.
179. Gerard, C. A comprehensive preclinical model evaluating the recombinant prame antigen combined with the as15 immunostimulant to fight against PRAME-

- expressing tumors /C. Gerard, N. Baudson, T. Ory et al// J Immunother. – 2015. – Vol. 38, № 8. – P. 311-20.
180. Pujol, J.-L. Safety and immunogenicity of the PRAME cancer immunotherapeutic in patients with resected non-small cell lung cancer: a phase I dose escalation study /J.-L. Pujol, T. De Pas, A. Rittmeyer et al// J Thorac Oncol. – 2016. – Vol. 11, № 12. – P. 2208-2217.
181. Adams, J. The proteasome: a suitable antineoplastic target /J. Adams// Nat Rev Cancer. – 2004. – Vol. 4, № 5. – P. 349-60.
182. Yerlikaya, A. Effect of bortezomib in combination with cisplatin and 5-fluorouracil on 4T1 breast cancer cells /A. Yerlikaya, S. Altıkat, R. Irmak et al// Mol Med Rep. – 2013. – Vol. 8, № 1. – P. 277-81.
183. Aras, B. Bortezomib and etoposide combinations exert synergistic effects on the human prostate cancer cell line PC-3 /B. Aras, A. Yerlikaya// Oncol Lett. – 2016. – Vol. 11, № 5. – P. 3179-3184.
184. Markowitz, J. A Phase I trial of bortezomib and interferon- $\alpha$ -2b in metastatic melanoma /J. Markowitz, E. A. Luedke, V. P. Grignol et al// J Immunother. – 2014. – Vol. 37, № 1. – P. 55-62.
185. Boccadoro, M. Preclinical evaluation of the proteasome inhibitor bortezomib in cancer therapy /M. Boccadoro, G. Morgan, J. Cavenagh// Cancer Cell Int. – 2005. – Vol. 5, № 1. – P. 18.
186. Tang, Z. GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses /Z. Tang, C. Li, B. Kang et al// Nucleic Acids Res. – 2017. – Vol. 45. – P. W98-W102.
187. Deaton, A. M. CpG islands and the regulation of transcription /A. M. Deaton, A. Bird// Genes Dev. – 2011. – Vol. 25, № 10. – P. 1010-1022.
188. Blattler, A. Cross-talk between site-specific transcription factors and DNA methylation states /A. Blattler, P. J. Farnham// J Biol Chem. – 2013. – Vol. 288, № 48. – P. 34287-94.
189. Wang, Z. A Practical Guide to The Cancer Genome Atlas (TCGA) /Z. Wang, M. A. Jensen, J. C. Zenklusen// Methods Mol Biol. – 2016. – Vol. 1418. – P. 111-41.



190. Stockert, J. C. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives /J. C. Stockert, R. W. Horobin, L. L. Colombo, A. Blazquez-Castro// *Acta Histochem.* – 2018. – Vol. 120, № 3. – P. 159-167.
191. Menendez, J. A. Effects of g-linolenic acid and oleic acid on paclitaxel cytotoxicity in human breast cancer cells /J. A. Menendez, M. del Mar Barbacid, S. Montero et al// *Eur J Cancer.* – 2001. – Vol. 37, № 3. – P. 402-13.
192. Chou, T.-C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies /T.-C. Chou// *Pharmacol Rev.* – 2006. – Vol. 58, № 3. – P. 621-81.
193. Galfre G. Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures /G. Galfre, C. Milstein// *Methods Enzymol.* – 1981. – 73. – P. 3–46.
194. Groth, A. C. Identification and characterization of enhancer-blocking insulators to reduce retroviral vector genotoxicity /A. C. Groth, M. Liu, H. Wang et al// *PLoS One.* – 2013. – Vol. 3, № 10. – P. e76528.
195. Strausbergab, R. L. Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences /R. L. Strausbergab, E. A. Feingoldc, L. H. Grous et al// *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2002. – Vol. 99, № 24. – P. 16899–16903.
196. Ota, T. Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs /T. Ota, Y. Suzuki, T. Nishikawa et al// *Nat Genet.* – 2004. – Vol. 36, № 1. – P. 40-5.
197. Collins, J. E. A genome annotation-driven approach to cloning the human ORFeome /J. E. Collins, C. L. Wright, C. A. Edwards et al// *Genome Biol.* – 2004. – Vol. 5, № 10. – P. R84.
198. Padykula, H. A. Marsupial placentation and its evolutionary significance /H. A. Padykula, J. M. Taylor// *J Reprod Fertil Suppl.* – 1982. – Vol. 31 . – P. 95-104.
199. Renfree, M. B. Review: marsupials: placental mammals with a difference /M. B. Renfree// *Placenta.* – 2010. – Vol. 31 – P. S21-6.

200. Chang, T.-C. The expansion of the PRAME gene family in Eutheria /T.-C. Chang, Y. Yang, H. Yasue et al// PLoS One. – 2011. – Vol. 6, № 2. – P. e16867.
201. Fagerberg, L. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics /L. Fagerberg, B. M. Hallstrom, P. Oksvold et al// Mol Cell Proteomics. – 2014. – Vol. 13, № 2. – P. 397-406.
202. Liu, W.-S. A novel testis-specific protein, PRAMEY, is involved in spermatogenesis in cattle /W.-S. Liu, Y. Zhao, C. Lu et al// Reproduction. – 2017. – Vol. 153, № 6. – P. 847-863.
203. Herve, J.-C. Gap-junction-mediated cell-to-cell communication /J.-C. Herve, M. Derangeon// Cell Tissue Res. – 2013. – Vol. 352, № 1. – P. 21-31.
204. Яворская Н.П. Противоопухолевая активность индолокарбазола ЛХС-1269. /Н.П. Яворская, И.С. Голубева, Л.В. Эктова, В.А. Еремина, Н.И. Тихонова, Т.Д. Миникер, М.В. Дмитриева// Российский биотерапевтический журнал. – 2016. – Т. 15, № 1. – С. 125-126.
205. Ye, H. PHF8 plays an oncogene function in hepatocellular carcinoma formation /H. Ye, Q. Yang, S. Qi, H. Li// Oncol Res. – 2019. – Vol. 27, № 5. – P. 613-621.
206. Fu, Y. The histone demethylase PHF8 promotes adult acute lymphoblastic leukemia through interaction with the MEK/ERK signaling pathway /Y. Fu, Y. Yang, X. Wang et al// Biochem Biophys Res Commun. – 2018. – Vol. 496, № 3. – P. 981-987.
207. Lv, Y. Histone demethylase PHF8 accelerates the progression of colorectal cancer and can be regulated by miR-488 in vitro /Y. Lv, Y. Shi, Q. Han, G. Dai et al// Mol Med Rep. – 2017. – Vol. 16, № 4. – P. 4437-4444.
208. El-Aarag, S. A. In silico identification of potential key regulatory factors in smoking-induced lung cancer /S. A. El-Aarag, A. Mahmoud, M. H. Hashem et al// BMC Med Genomics. – 2017. – Vol. 10. – P. 40.
209. Li, S. Histone demethylase PHF8 promotes progression and metastasis of gastric cancer /S. Li, A. Sun, X. Liang et al// Am J Cancer Res. – 2017. – Vol. 7, № 1. – P. 448-461.

210. Tong, D. The HIF/PHF8/AR axis promotes prostate cancer progression /D. Tong, Q. Liu, G. Liu et al// *Oncogenesis*. – 2016. – Vol. 5. – P. e283.
211. Shao, P. Histone demethylase PHF8 promotes epithelial to mesenchymal transition and breast tumorigenesis /P. Shao, Q. Liu, P. K. Maina et al// *Nucleic Acids Res*. – 2017. – Vol. 45, № 4. – P. 1687-1702.
212. Bkhetan, Z. A. Three-dimensional Epigenome Statistical Model: Genome-wide Chromatin Looping Prediction /Z. A. Bkhetan, D. Plewczynski// *Sci Rep*. – 2018. – Vol. 8, № 1. – P. 5217.
213. Loukinov, D. Targeting CTCFL/BORIS for the immunotherapy of cancer /D. Loukinov// *Cancer Immunol Immunother*. – 2018. – Vol. 67, № 12. – P. 1955-1965.
214. Sun, X. Oncogenic features of PHF8 histone demethylase in esophageal squamous cell carcinoma /X. Sun, J. J. Qiu, S. Zhu et al// *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8, № 10. – P. e77353.
215. Li, Y. G-quadruplexes in the BAP1 promoter positively regulate its expression /Y. Li, X. Zhang, Y. Gao et al// *Exp Cell Res*. – 2018. – Vol. 369, № 1. – P. 147-157.
216. Theodorou, E. A high throughput embryonic stem cell screen identifies Oct-2 as a bifunctional regulator of neuronal differentiation /E. Theodorou, G. Dalembert, C. Heffelfinger et al// *Genes Dev*. – 2009. – Vol. 23, № 5. – P. 575-88.
217. Pfisterer, P. Identification of target genes of the lymphoid-specific transcription factor Oct2 /P. Pfisterer, J. Hess, T. Wirth// *Immunobiology*. – 1997. – Vol. 198, № 1-3. – P. 217-26.
218. Dhingra, P. Identification of novel prostate cancer drivers, ERF, CREB3L1, and POU2F2, using RegNetDriver, a framework for integration of genetic and epigenetic alterations with tissue-specific regulatory network /P. Dhingra, A. Martinez-Fundichely, A. Berger et al// *Genome Biol*. – 2017. – Vol. 18, № 1. – P. 141.
219. Yokoyama, M. Isolation of a cDNA encoding a widely expressed novel zinc finger protein with the LeR and KRAB-A domains /M. Yokoyama, M. Nakamura, K. Okubo et al// *Biochim Biophys Acta*. – 1997. – Vol. 1353, № 1. – P. 13-7.

220. Callegari, A. Single-molecule dynamics and genome-wide transcriptomics reveal that NF- $\kappa$ B (p65)-DNA binding times can be decoupled from transcriptional activation /A. Callegari, C. Sieben, A. Benke et al// PLoS Genet. – 15. – Vol. 1. – P. e1007891.
221. Grosset, A.-A. Validation of the prognostic value of NF- $\kappa$ B p65 in prostate cancer: A retrospective study using a large multi-institutional cohort of the Canadian Prostate Cancer Biomarker Network /A.-A. Grosset, V. Ouellet, C. Caron et al// PLoS Med. – 2019. – Vol. 16, № 7. – P. e1002847.
222. Eguchi, T. Role and Regulation of Myeloid Zinc Finger Protein 1 in Cancer /T. Eguchi, T. Prince, B. Wegiel, S. K. Calderwood// J Cell Biochem. – 2015. – Vol. 116, № 10. – P. 2146-54.
223. Pugacheva, E. M. Comparative analyses of CTCF and BORIS occupancies uncover two distinct classes of CTCF binding genomic regions /E. M. Pugacheva, S. Rivero-Hinojosa, C. A. Espinoza et al// Genome Biol. – 2015. – Vol. 16, № 1. – P. 161.
224. Lee, Y.-K. Tumor antigen PRAME is up-regulated by MZF1 in cooperation with DNA hypomethylation in melanoma cells /Y.-K. Lee, U.-H. Park, E.-J. Kim et al// Cancer Lett. – 2017. – Vol. 403. – P. 144-151.
225. Лыжко, Н. А. Проявление цитостатического эффекта моноклональных антител к белку PRAME /Н. А. Лыжко, В. А. Мисюрин, Ю. П. Финашутина и др// Российский биотерапевтический журнал. – 2016. – Т. 15, № 4. – С 53-58.
226. Финашутина Ю.П. Патент на изобретение № 2652890 «Способ получения рекомбинантного белка GAGE1 человека» /Ю.П. Финашутина, В.А. Мисюрин, Е.Н. Пушкова, А.В. Мисюрин// 2016.
227. Клаан, Н. К. Транскрипционный фактор NF- $\kappa$ B как терапевтическая мишень в лечении злокачественных опухолей /Н. К. Клаан, Т. А. Пронина, Л. П. Акиньшина, В. В. Решетникова// Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 3-8.
228. Kikuno, R. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XIV. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large

- proteins in vitro /R. Kikuno, T. Nagase, K. Ishikawa et al// DNA Res. – 1999. – Vol. 6, № 3. – P. 187-205.
229. Patidar, A. DAMP-TLR-cytokine axis dictates the fate of tumor /A. Patidar, S. Selvaraj, A. Sarode et al// Cytokine. – . – Vol. 104. – P. 114-123.
230. Koo, J. W. Nuclear factor-kappaB is a critical mediator of stress-impaired neurogenesis and depressive behavior /J. W. Koo, S. J. Russo, D. Ferguson et al// Proc Natl Acad Sci U S A. – 2010. – Vol. 107, № 6. – P. 2669-2674.
231. Liang, H. Whole-exome sequencing combined with functional genomics reveals novel candidate driver cancer genes in endometrial cancer /H. Liang, L. W. T. Cheung, J. Li et al// Genome Res. – 2012. – Vol. 22, № 11. – P. 2120-2129.
232. Ozdemir, F. Methylation of selected tumor-suppressor genes in benign and malignant ovarian tumors /F. Ozdemir, J. Altinisik, A. Karateke et al// Exp Ther Med. – 2012. – Vol. 4, № 6. – P. 1092–1096.
233. Xiong, J. Tumor-suppressive microRNA-22 inhibits the transcription of E-box-containing c-Myc target genes by silencing c-Myc binding protein /J. Xiong, Q. Du, Z. Liang// Oncogene. – 2010. – Vol. 29, № 35. – P. 4980-8.
234. Pitolli, C. Do Mutations Turn p53 into an Oncogene? /C. Pitolli, Y. Wang, M. Mancini et al// Int J Mol Sci. – 2019. – Vol. 20, № 24. – P. 6241.
235. Xu, J.-M. KRAS mutations in tumor tissue and plasma by different assays predict survival of patients with metastatic colorectal cancer /J.-M. Xu, X.-J. Liu, F.-J. Ge et al// J Exp Clin Cancer Res. – 2014. – Vol. 33, № 1. – P. 104.
236. Reitman, Z. J. Promoting a new brain tumor mutation: TERT promoter mutations in CNS tumors /Z. J. Reitman, C. J. Pirozzi, H. Yan// Acta Neuropathol. – 2013. – Vol. 126, № 6. – P. 789-92.
237. Fredriksson, N. J. Systematic analysis of noncoding somatic mutations and gene expression alterations across 14 tumor types /N. J. Fredriksson, L. Ny, J. A. Nilsson, E. Larsson// Nat Genet. – 2014. – Vol. 46, № 12. – P. 1258-63.
238. Ribera, J.-M. Optimal approach to treatment of patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: how to best use all the

- available tools /J.-M. Ribera// *Leuk Lymphoma*. – 2013. – Vol. 54, № 1. – P. 21-7.
239. Bugler, J. Epigenetic Reprogramming and Emerging Epigenetic Therapies in CML /J. Bugler, R. Kinstrie, M. T. Scott, D. Vetrie// *Front Cell Dev Biol*. – 2019. – Vol. 17, № 7. – P. 136.
240. Gutierrez-Cosio, S. Epigenetic regulation of PRAME in acute myeloid leukemia is different compared to CD34+ cells from healthy donors: Effect of 5-AZA treatment /S. Gutierrez-Cosio, L. de la Rica, E. Ballestar et al// *Leuk Res*. – 2012. – Vol. 36, № 7. – P. 895-9.
241. Rual, J.-F. Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network /J.-F. Rual, K. Venkatesan, T. Hao et al// *Nature*. – 2005. – Vol. 437, № 7062. – P. 1173-8.
242. Sekulic, A. Malignant melanoma in the 21st century: the emerging molecular landscape /A. Sekulic, P. Haluska, A. J. Miller et al// *Mayo Clin Proc*. – 2008. – Vol. 83, № 7. – P. 825-46.
243. Cheriyaath, V. G1P3, an IFN-induced survival factor, antagonizes TRAIL-induced apoptosis in human myeloma cells /V. Cheriyaath, K. B. Glaser, J. F. Waring et al// *J Clin Invest*. – 2007. – Vol. 117, № 10. – P. 3107-17.
244. Guo, C. ACTB in cancer /C. Guo, S. Liu, J. Wang et al// *Clin Chim Acta*. – 2013. – Vol. 417. – P. 39-44.
245. Tang, M. EMP2 re-expression inhibits growth and enhances radiosensitivity in nasopharyngeal carcinoma /M. Tang, R.-Y. Liu, C. Zhou et al// *Tumour Biol*. – 2017. – Vol. 39, № 3. – P. 1010428317695972.
246. Percy, M. J. Expression and mutational analysis of the human MAD2L1 gene in breast cancer cells /M. J. Percy, K. A. Myrie, C. K. Neeley et al// *Genes Chromosomes Cancer*. – 2000. – Vol. 29, № 4. – P. 356-62.
247. Bloch, D. B. Sp110 localizes to the PML-Sp100 nuclear body and may function as a nuclear hormone receptor transcriptional coactivator /D. B. Bloch, A. Nakajima, T. Gulick et al// *Mol Cell Biol*. – 2000. – Vol. 20, № 16. – P. 6138-46.

248. Regis, G. Ups and downs: the STAT1:STAT3 seesaw of Interferon and gp130 receptor signaling /G. Regis, S. Pensa, D. Boselli et al// *Semin Cell Dev Biol.* – 2008. – Vol. 19, № 4. – P. 351-9.
249. Passeron, T. Upregulation of SOX9 inhibits the growth of human and mouse melanomas and restores their sensitivity to retinoic acid /T. Passeron, J. C. Valencia, T. Namiki et al// *J Clin Invest.* – 2009. – Vol. 119, № 4. – P. 954-63.
250. Chomez, P. An overview of the MAGE gene family with the identification of all human members of the family /P. Chomez, O. De Backer, M. Bertrand, E. D. Plaen et al// *Cancer Res.* – 2001. – Vol. 61, № 14. – P. 5544-51.
251. Cho, H. J. Physical interaction of two cancer-testis antigens, MAGE-C1 (CT7) and NY-ESO-1 (CT6) /H. J. Cho, O. L. Caballero, S. Gnjatic et al// *Cancer Immun.* – 2006. – Vol. 6. – P. 12.
252. Jang, S. J. Activation of melanoma antigen tumor antigens occurs early in lung carcinogenesis /S. J. Jang, J. C. Soria, L. Wang et al// *Cancer Res.* – 2001. – Vol. 61, № 21. – P. 7959-63.
253. Doyle, J. M. MAGE-RING protein complexes comprise a family of E3 ubiquitin ligases /J. M. Doyle, J. Gao, J. Wang et al// *Mol Cell.* – 2010. – Vol. 39, № 6. – P. 963-74.
254. Xiao, T. Z. MAGE proteins regulate KRAB zinc finger transcription factors and KAP1 E3 ligase activity /T. Z. Xiao, Y. Suh, B. J. Longley// *Arch Biochem Biophys.* – 2014. – Vol. 563. – P. 136-44.
255. Newman, J. A. Structures of two melanoma-associated antigens suggest allosteric regulation of effector binding /J. A. Newman, C. D. O. Cooper, A. K. Roos et al// *PLoS One.* – 2016. – Vol. 11, № 2. – P. e0148762.
256. Xiao, T. Z. MAGE I transcription factors regulate KAP1 and KRAB domain zinc finger transcription factor mediated gene repression /T. Z. Xiao, N. Bhatia, R. Urrutia et al// *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6, № 8. – P. e23747.
257. Pineda, C. T. Degradation of AMPK by a cancer-specific ubiquitin ligase /C. T. Pineda, S. Ramanathan, K. F. Tacer et al// *Cell.* – 2015. – Vol. 160, № 4. – P. 715-728.

258. Pineda, C. T. Oncogenic MAGEA-TRIM28 ubiquitin ligase downregulates autophagy by ubiquitinating and degrading AMPK in cancer /C. T. Pineda, P. R. Potts// *Autophagy*. – 2015. – Vol. 11, № 5. – P. 844-846.
259. Shaw, R. J. Tumor metabolism: MAGE-A proteins help trim turn over AMPK /R. J. Shaw// *Curr Biol*. – 2015. – Vol. 25, № 10. – P. R418-20.
260. Kelwick, R. The ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) family /R. Kelwick, I. Desanlis, G. N. Wheeler, D. R. Edwards// *Genome Biol*. – 2015. – Vol. 16, № 1. – P. 113.
261. Li, G. Prediction of Biomarkers of Oral Squamous Cell Carcinoma Using Microarray Technology /G. Li, X. Li, M. Yang et al// *Sci Rep*. – 2017. – Vol. 7. – P. 42105.
262. Wang, X.-Y. Comparisons for Detecting NY-ESO-1 mRNA Expression Levels in Hepatocellular Carcinoma Tissues /X.-Y. Wang, H.-S. Chen, S. Luo et al// *Oncol Rep*. – 2009. – Vol. 21, № 3. – P. 713-9.
263. Bennett, E. J. Dynamics of cullin-RING ubiquitin ligase network revealed by systematic quantitative proteomics /E. J. Bennett, J. Rush, S. P. Gygi, J. W. Harper// *Cell*. – 2010. – Vol. 143, № 6. – P. 951–965.
264. Bellgrau, D. A role for CD95 ligand in preventing graft rejection /D. Bellgrau, D. Gold, H. Selawry et al// *Nature*. – 1995. – Vol. 377, № 6550. – P. 630-2.
265. Brandenberger, R. Transcriptome characterization elucidates signaling networks that control human es cell growth and differentiation /R. Brandenberger, H. Wei, S. Zhang et al// *Nat Biotechnol*. – 2004. – Vol. 22, № 6. – P. 707-16.
266. Wu, F. Epigenetic silencing of DUSP9 induces the proliferation of human gastric cancer by activating JNK signaling /F. Wu, T. Lv, G. Chen et al// *Oncol Rep*. – 2015. – Vol. 34, № 1. – P. 121-8.
267. Xiao, X. Novel mutations in PRPF31 causing retinitis pigmentosa identified using whole-exome sequencing /X. Xiao, Y. Cao, Z. Zhang et al// *Invest Ophthalmol Vis Sci*. – 2017. – Vol. 58, № 14. – P. 6342-6350.



268. Iyer, G. S. Identification of a testis-expressed creatine transporter gene at 16p112 and confirmation of the X-linked locus to Xq28 /G. S. Iyer, R. Krahe, L. A. Goodwin et al// Genomics. – 1996. – Vol. 34, № 1. – P. 143-6.
269. Sung, C. K. The tumor suppressor protein p150(Sal2) in carcinogenesis /C. K. Sung, H. Yim// Tumour Biol. – 2015. – Vol. 36, № 2. – P. 489-94.
270. Ravassard, P. ZNF74, a gene deleted in DiGeorge syndrome, is expressed in human neural crest-derived tissues and foregut endoderm epithelia /P. Ravassard, F. Cote, B. Grondin et al// Genomics. – 1999. – Vol. 62, № 1. – P. 82-5.
271. Мисюрин, В. А. Особенности соотношения уровней экспрессии генов PRAME и PML/RAR $\alpha$  в дебюте острого промиелоцитарного лейкоза /В. А. Мисюрин, А. Е. Лукина, А. В. Мисюрин и др// Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 9-16.
272. Мисюрин, В. А. Прогностическое значение экспрессии гена PRAME при солидных опухолях /В. А. Мисюрин// Иммунология. – 2018. – Т. 39, № 1. – С. 67-73.
273. Мисюрин, В. А. Клиническое значение экспрессии гена PRAME при онкогематологических заболеваниях /В. А. Мисюрин// Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2018. – Т. 11, № 1. – С. 26-33.
274. Финашутина, Ю. П. Получение рекомбинантного раково-тестикулярного белка PRAME и моноклональных антител к нему /Ю. П. Финашутина, А. В. Мисюрин, Т. В. Ахлынина, и др// Российский биотерапевтический журнал. – 2015. – Т. 14, № 3. – С. 29-37.
275. Вотякова, О. М. Новые возможности лечения рецидивов и рефрактерной множественной миеломы (обзор литературы) /О. М. Вотякова// Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2017. – Т. 10, № 4. – С. 425-434.
276. Dayalu P. Huntington disease: pathogenesis and treatment /P. Dayalu, R. L. Albin// Neurol Clin. – 2015. – Vol. 33, № 1. – P. 101-114.

277. Keiser M. S. Gene suppression strategies for dominantly inherited neurodegenerative diseases: lessons from Huntington's disease and spinocerebellar ataxia /M. S. Keiser, H. B. Kordasiewicz, J. L. McBride// *Hum Mol Genet.* – 2016. – Vol. 25, № R1. – P. 53-64.
278. Lei, H. Axon guidance pathways served as common targets for human speech/language evolution and related disorders /H. Lei, Z. Yan, X. Sun et al// *Brain Lang.* – 2017. – Vol. 174. – P. 1-8.
279. Mistry, B. V. Differential expression of PRAMEL1, a cancer/testis antigen, during spermatogenesis in the mouse /B. V. Mistry, Y. Zhao, T.-C. Chang et al// *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8, № 4. – P. e60611.
280. Astakhova, T. M. Combined effect of bortezomib and menadione sodium bisulfite on proteasomes of tumor cells: the dramatic decrease of bortezomib toxicity in a preclinical trial /T. M. Astakhova, A. V. Morozov, P. A. Erokhov et al// *Cancers (Basel).* – 2018. – Vol. 10, № 10. – P. 351.
281. Ben-Horin, S. Pharmacokinetics and immune reconstitution following discontinuation of thiopurine analogues: implications for drug withdrawal strategies /S. Ben-Horin, G. V. Assche, Y. Chowers et al// *J Crohns Colitis.* – 2018. – Vol. 12, № 12. – P. 1410-1417.
282. Qi, H. H. PHF8 reduces the H3K9me2 level at the E2F4 transcriptional start site, demonstrating a direct function of PHF8 in endothelial E2F4 gene regulation /H. H. Qi, M. Sarkissian, G.-Q. Hu et al// *Nature.* – 2010. – Vol. 466, № 7305. – P. 503-7.
283. Curran, M. P. Bortezomib: a review of its use in patients with multiple myeloma /M. P. Curran, K. McKeage// *Drugs.* – 2009. – Vol. 69, № 7. – P. 859-88.
284. Silverman, J. A. Marqibo (R) (vincristine sulfate liposome injection) improves the pharmacokinetics and pharmacodynamics of vincristine /J. A. Silverman, S. R. Deitcher// *Cancer Chemother Pharmacol.* – 2013. – Vol. 71, № 3. – P. 555-64.
285. Morris, P. G. Microtubule active agents: beyond the taxane frontier /P. G. Morris, M. N. Fornier// *Clin Cancer Res.* – 2008. – Vol. 14, № 22. – P. 7167-72.

286. Dasari, S. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action /S. Dasari, P. B. Tchounwou// *Eur J Pharmacol.* – 2014. – Vol. 5, № 0. – P. 364-378.
287. Kim, H. L. Molecular and genomic approach for understanding the gene-environment interaction between Nrf2 deficiency and carcinogenic nickel-induced DNA damage /H. L. Kim, Y. R. Seo// *Oncol Rep.* – 2012. – Vol. 28, № 6. – P. 1959-67.
288. Mandili, G. Characterization of the protein ubiquitination response induced by doxorubicin /G. Mandili, A. Khadjavi, V. Gallo et al// *FEBS J.* – 2012. – Vol. 279, № 12. – P. 2182-91.
289. Facon, T. Melphalan and prednisone plus thalidomide versus melphalan and prednisone alone or reduced-intensity autologous stem cell transplantation in elderly patients with multiple myeloma (IFM 99-06): a randomised trial /T. Facon, J. Y. Mary, C. Hulin et al// *Lancet.* – 2007. – Vol. 370, № 9594. – P. 1209-18.
290. Gobin, Y. P. Intra-arterial chemotherapy for the management of retinoblastoma: four-year experience /Y. P. Gobin, I. J. Dunkel, B. P. Marr et al// *Arch Ophthalmol.* – 2011. – Vol. 129, № 6. – P. 732-7.
291. Gullbo, J. Antitumor activity of the novel melphalan containing tripeptide J3 (L-prolyl-L-melphalanyl-p-L-fluorophenylalanine ethyl ester): Comparison with its m-L-sarcosyl analogue P2 /J. Gullbo, C Wallinder, M. Tullberg et al// *Mol Cancer Ther.* – 2003. – Vol. 2, № 12. – P. 1331-9.
292. Emadi, A. Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary /A. Emadi, R. J. Jones, R. A. Brodsky// *Nat Rev Clin Oncol.* – 2009. – Vol. 6, № 11. – P. 638-47.
293. Rezvanfar, M. Protection of cyclophosphamide-induced toxicity in reproductive tract histology, sperm characteristics, and DNA damage by an herbal source; evidence for role of free-radical toxic stress /M. Rezvanfar, R. Sadrkhanlou, A. Ahmadi et al// *Hum Exp Toxicol.* – 2008. – Vol. 27, № 12. – P. 901-10.
294. Pankov, D. In vivo immuno-targeting of an extracellular epitope of membrane bound preferentially expressed antigen in melanoma (PRAME) /D. Pankov, L. Sjostrom, T. Kalidindi et al// *Oncotarget.* – 2017. – Vol. 8, № 39. – P. 65917-65931.

295. Финашутина, Ю. П. Повышение уровня экспрессии гена PRAME в опухолевых клетках сопровождается локализацией белка в клеточном ядре /Ю. П. Финашутина, А. В. Мисюрин, Т. В. Ахлынина и др// Российский биотерапевтический журнал. – 2015. – Т. 14, № 3. – С. 29-37.
296. Amir, A. L. PRAME-specific allo-HLA–restricted T cells with potent antitumor reactivity useful for therapeutic T-cell receptor gene transfer /A. L. Amir, D. M. van der Steen, M. M. van Loenen et al// Clin Cancer Res. – 2011. – Vol. 17, № 17. – P. 5615-25.
297. Солопова, О. Н. Биспецифические антитела в клинике и клинических исследованиях (обзор литературы) /О. Н. Солопова, В. А. Мисюрин// Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2019. – Т. 12, № 2. – С. 25-44.
298. Dillman, R.O. Cancer immunotherapy /R.O. Dillman// Cancer Biother Radiopharm. – 2011. – Vol. 26. – P. 1-64.
299. Theisen, D. The role of cDC1s in vivo: CD8 T cell priming through cross-presentation /D. Theisen, K. Murphy// F1000Res. – 2017. – Vol. 6. – P. 98.
300. Carvalho, D. D. De PRAME/EZH2-mediated regulation of TRAIL: a new target for cancer therapy /D. D. De Carvalho, B. P. Mello, W. O. Pereira, G. P. Amarante-Mendes// Curr Mol Med. – 2013. – Vol. 13, № 2. – P. 296-304.