

УДК 577.22

## АНАЛІЗ ЕКСПРЕСІЇ ІЗОФОРМ *ITSN2* ТА *TKS5* В ПУХЛИНАХ ГРУДНОЇ ЗАЛОЗИ ЛЮДИНИ

С. В. КРОПИВКО<sup>1</sup>, Л. О. ЦИБА<sup>1</sup>, О. В. НОВОХАЦЬКА<sup>1</sup>, Л. А. СИВАК<sup>2</sup>,  
Т. Є. ТАРАСЕНКО<sup>2</sup>, О. М. ГРАБОВИЙ<sup>2</sup>, А. В. РИНДИЧ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Інститут молекулярної біології і генетики НАН України  
Україна, Київ, 03143, вул. Заболотного, 150  
e-mail: s.v.kropyvko@imbg.org.ua

<sup>2</sup>Національний інститут раку  
Україна, Київ, 03022, вул. Ломоносова, 33/34

**Мета.** Незважаючи на великий прогрес у лікуванні, 15 % випадків раку молочної залози залишаються летальними. Попри багаторічні дослідження та великий досвід у лікуванні цього виду раку, однією з основних проблем в діагностиці та лікуванні є його висока клінічна і генетична гетерогенність, тож виявлення маркерів для персоналізованого лікування хворих є актуальним питанням і досі. **Методи.** Збір клінічного матеріалу, виділення РНК та аналіз експресії ізоформ *ITSN2* та *TKS5* за допомогою кількісного ПЛР в реальному часі, використовуючи флюорисцентно мічені зонди. **Результати.** Ми виявили що, *ITSN2-S* достовірно знижує свою експресію в *HER2/neu*-позитивних пухлинах з поганим прогнозом. Достовірних відмінностей в експресії *ITSN2-L* та *TKS5-L* в аналізованих зразках виявлено не було. **Висновки.** Ці дослідження показали можливість виявлення короткої ізоформи *ITSN2* (*ITSN2-S*) як прогностичного маркера цього захворювання.

**Ключові слова:** рак молочної залози, *ITSN2*, *TKS5*, аналіз експресії.

**Вступ.** Злоякісні новоутворення молочної залози є одними з найбільш розповсюджених серед онкологічних захворювань у жінок. Згідно з даними проекту GLOBOCAN Міжнародного центру досліджень ракових захворювань, за п'ять років (з 2008 по 2012 роки) у світі було виявлено 6,23 млн (36 % всіх пухлин у жінок) нових випадків цього захворювання, 15 % з яких були летальними. Незважаючи на багаторічні дослідження та великий досвід у лікуванні цього виду раку, однією з основних проблем в діагностиці та лікуванні є його висока клінічна і генетична гетерогенність.

На сьогодні, з урахуванням особливостей експресії маркерних генів, з клінічної та терапевтичної точки зору, цю групу захворювань поділяють на 4 основних типи, критерієм поділу на які є експресія рецепторів естрогену (ER), прогестерону (PR) та форми рецептору епідермального фактору росту (*HER2/neu*): люмінальний А, люмінальний Б, *HER2*-збагачений та тричі негативний типи [1].

В таблиці 1 зведено дані по класифікації раку молочної залози на типи та підтипи в залежності від експресії певних молекулярних маркерів, які були відкриті впродовж останніх років [2–9].

На цій класифікації базується визначення агресивності пухлин та вибір стратегії подальшого лікування пацієнтів. Як видно з таблиці 1, навіть в межах одного типу також існує певна гетерогенність пухлин, які мають свій прогноз подальшого перебігу хвороби і чутливість до певного лікування. Так, для прикладу, тричі негативний тип пухлин за останніми дослідженнями має щонайменше вісім підтипів, серед яких три з поганим прогнозом, три — з проміжним та два — із гарним [4, 7]. Так само пухлини люмінального Б типу поділяють на два підтипи: люмінальний Б *HER2/neu*<sup>+</sup> та люмінальний Б *HER2/neu*<sup>-</sup>, які мають свої особливості при виборі подальшого лікування.

**Аналіз експресії ізоформ ITSN2 та TKS5B пухлинах грудної залози людини**

Кожному з підтипів, окрім трьох–чотирьох основних маркерів, властивий набір специфічних маркерів, які більш індивідуально характеризують окремі пухлини та допомагають провести більш індивідуальний вибір подальшої стратегії лікування пацієнтів, але все одно ці дані є узагальненням результатів, отриманих від великої кількості пацієнтів. На практиці ледь не кожна окрема пухлина має специфічну експре-

сію зазначених в таблиці 1 маркерів. У зв'язку з цим набирає актуальності ідея персоналізованого лікування кожного окремого пацієнта в залежності від характеристики отриманої для нього суми маркерів. Як наведено вище, близько 15 % випадків раку молочної залози від загальної кількості є летальними, в тому числі через невірно підібрану стратегію лікування.

**Таблиця 1.** Класифікація раку молочної залози: гістологія, молекулярні маркери та прогноз подальшого перебігу (виживаності) [2–9].

Типи	Підтипи	Додаткові маркерні гени		Прогноз
<b>Люмінальний А</b> ER <sup>+</sup> PR <sup>+</sup> HER2/neu <sup>-</sup> ≈40-60% [2, 5, 6, 7]		Низький Ki-67	CK8/18 <sup>+</sup> , FOXA1 <sup>+</sup> , ESR1, GATA3, KRT8, KRT18, XBP1, FOXA1, TFF3, CCND1, LIV1, CK5/6 <sup>-</sup> , EGFR <sup>-</sup>	Гарний
<b>Люмінальний Б</b> ER <sup>+</sup> PR <sup>+</sup> HER2/neu <sup>+/-</sup> ≈6-20% [2, 5, 6, 7]	<b>Люмінальний Б HER2<sup>-</sup></b> ER <sup>+</sup> PR <sup>+</sup> HER2/neu <sup>-</sup> ≈15-20% [5]	Високий Ki-67	ESR1, GATA3, KRT8, KRT18, XBP1, FOXA1, TFF3, SQLE, LAPTM4B, CK5/6 <sup>-</sup> , EGFR <sup>-</sup> , TP53 <sup>-</sup>	Проміжний
	<b>Люмінальний Б HER2<sup>+</sup></b> ER <sup>+</sup> PR <sup>+</sup> HER2/neu <sup>+</sup> ≈6% [5]			Поганий/ Проміжний
<b>HER2 збагачений</b> ER <sup>-</sup> PR <sup>-</sup> HER2/neu <sup>+</sup> ≈10-20% [2, 5, 6, 7]			CK5/6 <sup>+</sup> GRB7 <sup>+</sup> , ERBB2, EGFR <sup>+/-</sup> TP53 <sup>-</sup>	Поганий
<b>Тричі негативний</b> ER <sup>-</sup> PR <sup>-</sup> HER2/neu <sup>-</sup> ≈5-25% [2, 3, 6, 7, 9]	<b>Аденоїдна кістозна карцинома</b> ≈1% [4, 8]	Злиття генів MYB-NFIB	EGFR <sup>+</sup> , CK5/6 <sup>+</sup> , CK14 <sup>+</sup> , CK17 <sup>+</sup> HER1 <sup>+</sup> , Cyclin E <sup>+</sup> , CDKN2A <sup>+</sup> , KRT5, CDH3, ID4, FABP7, KRT17, TRIM29, LAMC2, ITGB4	Гарний
	<b>Медулярна карцинома</b> ≈2% [4]			Гарний
	<b>BRCA1-асоційований</b> [4]			ID4 <sup>+</sup>
	<b>Базальний</b> ≈10-25% [3, 4, 5, 7]	BRCA1 <sup>-</sup> , TP53 <sup>-</sup> , CDKN2A <sup>+</sup> , RB1, FGFR2, маркери стовбурових клітин <sup>+</sup> , CK5/6 <sup>+</sup> , EGFR <sup>+</sup>		Поганий
	<b>З низьким клаудіном</b> ≈7-14% [4, 6, 7]	GATA3-регулятори <sup>-</sup> , гени адгезії клітин, CDH1 <sup>-</sup> , клаудін <sup>-</sup> , CK5/6 <sup>+/-</sup> , EGFR <sup>+/-</sup> , CD44 <sup>+</sup> , SNAI3 <sup>+</sup>		Поганий
	<b>Метапластична карцинома</b> ≈1% [4, 7]	GATA3-регулятори <sup>-</sup> , гени адгезії клітин, PIK3CA <sup>-</sup> , AKT <sup>-</sup> або KRAS <sup>-</sup> , EMT <sup>+</sup> , маркери стовбурових клітин <sup>+</sup>		Проміжний
	<b>Апокринна карцинома</b> [4]			Проміжний
	<b>Інтерферон збагачений</b> ≈10% [7]	STAT1 <sup>+</sup> , SP110 <sup>+</sup> , інтерферон-регулюючі гени <sup>+</sup>		Проміжний

Значний прогрес було досягнуто протягом останніх років завдяки розвитку технологій з профілювання експресії генів. Було виявлено десятки нових маркерних генів для характеристики пухлин молочної залози. Так, в експериментах з аналізу експресії генів за допомогою мікрочипів було встановлено, що гени *ITSN2*, *CXCL9* та *GNAI2* є одними з небагатьох, рівень експресії яких суттєво відрізняється в зразках пухлин раку молочної залози пацієнтів, у яких виникали рецидиви хвороби, та у пацієнтів, що залишалися здоровими після видалення пухлини та з використанням ЦМФ (циклофосфамід, метотрексат та фторурацил) хіміотерапії. Високий рівень експресії *ITSN2*, *CXCL9* та *GNAI2* корелював з відсутністю у пацієнтів віддалених метастазів протягом довгого періоду. Крім того, було встановлено, що співвідношення експресії лише двох генів, *CXCL9/ITSN2* може бути незалежним прогностичним фактором для передбачення відсутності рецидивів хвороби [10].

*ITSN2* є адапторним/скафолдним білком [11], що задіяний у багатьох клітинних функціях, серед яких є клатрин-опосередкований ендоцитоз [12], реорганізація актинового цитоскелету [13], передача клітинних сигналів та інше [14]. У тканинах експресується дві основні ізоформи *ITSN2*: коротка (*ITSN2-S*) та довга (*ITSN2-L*), які відрізняються наявністю трьох додаткових доменів у *ITSN2-L*. Нещодавно було показано взаємодію *ITSN2* з *WIP*, який є маркерним білком інвадоподій [15, 16]. Інвадоподії є структурами інвазивності ракових клітин, що відповідають за їх рухливість та метастазування [17].

Інша нещодавно відкрита родина скафолдних білків TKS: TKS4 та TKS5, які відіграють ключову роль в утворенні інвадоподій [18]. Багато експериментів з нокауту та нокадауну цих двох генів демонстрували зниження або повну відсутність утворення інвадоподій [19]. Так само, як і для *ITSN2*, для *TKS4* та *TKS5* характерний множинний альтернативний сплайсинг. В гені *TKS5* присутні три альтернативних промотори, з яких відповідно транскрибуються три короткі ізоформи, де відсутній РХ-домен, відповідальний за зв'язування з мембраною. Підвищений рівень мРНК довгої ізоформи *TKS5* (*TKS5-L*), яка містить всі домени, та понижений рівень мРНК короткої ізоформи корелюють з прогресією метастазування та поганим прогнозом виживання хворих на аденокарциному легенів [20].

Наведені дані свідчать про високий потенціал генів *ITSN2*, *TKS5* та їх ізоформ, як прогностичних маркерів онкозахворювань, зокрема раку молочної залози. Тому нами було вирішено перевірити рівні експресії мРНК короткої та довгої ізоформ *ITSN2* та довгої ізоформи *TKS5* в зразках пухлин молочної залози на рівні РНК за допомогою кількісної ЗТ-ПЛР в реальному часі для оцінки можливості використання мРНК цих генів як прогностичних маркерів перебігу захворювання на рак молочної залози.

### Матеріали та методи дослідження

*Отримання препаратів тотальної РНК пухлин молочної залози.* Зразки пухлин молочної залози, отримані з Національного інституту раку, заморожували в рідкому азоті відразу після операції і зберігали при  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Тотальну РНК виділяли з 0,2–0,9 г тканини гуанідинізоціанатним методом за допомогою реагенту innuSOLV (Analytik Jena) відповідно до рекомендацій виробника. Клінічна інформація отриманих зразків представлена в таблиці 2.

*Синтез кДНК на препаратах тотальної РНК пухлин молочної залози.* 5 мкг тотальної РНК попередньо обробляли ДНКазою I (Fermentas), відповідно до рекомендацій виробника, для видалення залишків геномної ДНК. Після цього проводили синтез кДНК в об'ємі 20 мкл за рекомендацією виробника. кДНК зберігали до використання при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

*Полімеразна ланцюгова реакція з флюорисцентно міченими зондами.* ПЛР виконували з використанням Taq-Man-зонду. ПЛР проводили в 25 мкл суміші, яка містила 0,2 мкМ кожного специфічного праймера та 0,1 мкМ Taq-Man зонду, 1,5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 мМ dNTP, 2,5 од. Taq ДНК-полімерази (Fermentas) і відповідний буфер. Ампліфікацію здійснювали за таких умов: денатурація —  $+94\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 15 сек (в першому циклі — 2 хв); час та температуру реасоціації праймерів та синтезу об'єднували:  $+60\text{ }^{\circ}\text{C}$  1 хв, протягом 50 циклів. Кожний зразок аналізувався в трьох повторах. ПЛР проводили на приладі iQ5 «BioRad». Ген *TBP* був обраний в якості референтного ендogenous контролю на основі аналізу джерел літератури, що показали доцільність його використання для вивчення експресії генів у пухлинах при захворюванні на рак молочної залози [21, 22, 23].

Таблиця 2. Клінічна інформація пухлин пацієнтів, зразки яких включено в дослідження

Гістологічний тип пухлини	Кількість зразків
Інфільтруючий дольковий	44
Інфільтруючий протоковий	4
Інфільтруючий дольково-протоковий	8
Інфільтруючий недиференційований	1
<b>TNM-класифікація (tumor, nodus and metastasis)</b>	
T1	17
T2	40
N0	40
N1	9
N2	8
M0	56
M1	1
<b>Ступінь диференціювання (G)</b>	
G1	13
G2	35
G3	8
G4	1
<b>Рецепторний статус</b>	
ER <sup>+</sup> PR <sup>+</sup> HER2/neu <sup>-</sup>	31
ER <sup>-</sup> PR <sup>-</sup> HER2/neu <sup>-</sup>	11
ER <sup>+</sup> PR <sup>+</sup> HER2/neu <sup>+</sup>	8
ER <sup>-</sup> PR <sup>-</sup> HER2/neu <sup>+</sup>	7

Праймери та зонди, які використовували для ПЛР: (For. *TBP* 634-654 5'gtgcccgaacgccgaatata3', Таq-Man зонд *TBP* 655-676 5' (FAM)atcccaagcggg(BHQ1)ttgctgcgggt3', Rev. *TBP* 708-688 5'ccgtggtcgtggctctctta3'); (For. *ITSN2-S* 3798-3821 5'cgtaagatgacgacagactcaga3', Таq-Man зонд *ITSN2-S* 3820-3844 5'(FAM)cagcacaccact(BHQ1)gttgactggatc3', Rev. *ITSN2-S* 3866-3845 5'attgtgccagggttgacagat3'); For. *ITSN2-L* 4324-4345 5'cgctaccactgctcatcagaa3', Таq-Man зонд *ITSN2-L* 4362-4385 5'(FAM)cccggagagccat(BHQ1)gcagaccattc3', Rev. *ITSN2-L* 4382-4403 5'agggccagcttagggaggaat3'; *TKS5* For. *TKS5-L* 239-262 5'tgactccacctccagactatcta3', Таq-Man зонд *TKS5-L* 354-379 5' (BHQ2)atcccctctcccaggcaagatcct(ROX)3', Rev. *TKS5-L* 407-431 5'gatggctcagctctcacagct3'.

Позиції нуклеотидів для праймерів відповідають кДНК *TBP* з реєстраційним номером в нуклеотидній базі даних GenBank NM\_006277, довгої та короткої ізоформ *ITSN2* людини — NM\_147152 та NM\_001172085.1 відповідно, *TKS5* — NM\_014631.

Обчислення результатів ПЛР в реальному часі. Для обчислення результатів ПЛР використовували формулу:  $E_{\text{exp}} = E_{\text{target}}^{-Ct(\text{target})} / E_{\text{ref}}^{-Ct(\text{ref})}$ , де  $E_{\text{target}}$  — ефективність ПЛР досліджуваного гена,  $E_{\text{ref}}$  — ефективність ПЛР референсного гена,  $Ct(\text{target})$  — середнє значення циклів досліджуваного гена,  $Ct(\text{ref})$  — середнє значення циклів референсного гена. Ефективність ПЛР визначали за допомогою пакету програм «R». Для цього в алгоритм програми вводили показники флуоресценції в проміжку між 10 та 35–40 циклами ПЛР-реакції, в результаті чого отримували показник ефективності кожної окремої ПЛР-реакції. Отримані значення ефективності підставляли у формулу обчислення результатів ПЛР в реальному часі. Значення циклів досліджуваного та референсного генів визначали за точкою перетину кривими флуоресценції порога (threshold), вище якого значення флуоресценції вважаються значущими. Рівень threshold встановлювався для всіх експериментів однаковим на рівні 100 RFU. Статистичну обробку отриманих даних ПЛР проводили з використанням прикладної статистичної програми «Statistica v.8.0» методом ANOVA з використанням критерію Фішера.

### Результати та обговорення

Аналіз експресії мРНК *ITSN2* в зразках пухлин молочної залози методом кількісної ЗТ-ПЛР. У роботі Specht і співроб. [10] методом кількісної ЗТ-ПЛР було показано, що високий рівень мРНК *ITSN2* в хірургічно видалених зразках пухлин молочної залози корелює з відсутністю у пацієнтів віддалених метастазів протягом довгого періоду, проте в цій роботі не було перевірено можливі відмінності в експресії мРНК різних ізоформ *ITSN2*, які утворюються в результаті альтернативного сплайсингу.

Ми провели такий аналіз на зразках пухлин різних стадій отриманих в Національному інституті раку. В таблиці 2 представлено дані про пухлини пацієнтів, зразки яких було проаналізовано в роботі. Ці зразки було розділено на три групи. Перша група включала в себе пухлини з гарним/проміжним прогнозом, які мали рецепторний статус  $ER^+PR^+HER2/neu^-$ , або люміна-

льний А тип. Друга група містила зразки з тричі негативним статусом ( $ER^-PR^-HER2/neu^-$ ). Ця група найбільш гетерогенна, проте більшість (60–100 %) пухлин у пацієнтів з цим діагнозом мають поганий прогноз виживаності (табл. 1) [4]. Третя група об'єднувала пухлини люмінального Б типу та *HER2/neu*-збагаченого типу, рецепторний статус яких відповідно був  $ER^{+/-}PR^{+/-}HER2/neu^+$ . Пацієнти з такими пухлинами мали поганий прогноз виживаності.

Загальний вміст мРНК *ITSN2-L* та *ITSN2-S* в зразках пухлин з рецепторним статусом  $ER^{+/-}PR^{+/-}HER2/neu^+$  був достовірно нижчий ( $p = 0.043$ ), ніж у пухлинах з тричі негативним статусом рецепторів, і складав 1,17–5,11 ум.од. (медіана — 2,16 ум. од.) проти 1,62–7,7 ум. од. (медіана — 2,89 ум. од.). Рівень експресії двох форм *ITSN2* у пухлинах  $ER^{+/-}PR^{+/-}HER2/neu^+$  виявився також нижчий, ніж у пухлинах пацієнтів із сприятливим прогнозом  $ER^+PR^+HER2/neu^-$ : 0,97–7,39 ум. од. (медіана — 3,69 ум. од.) (рис. 1А).

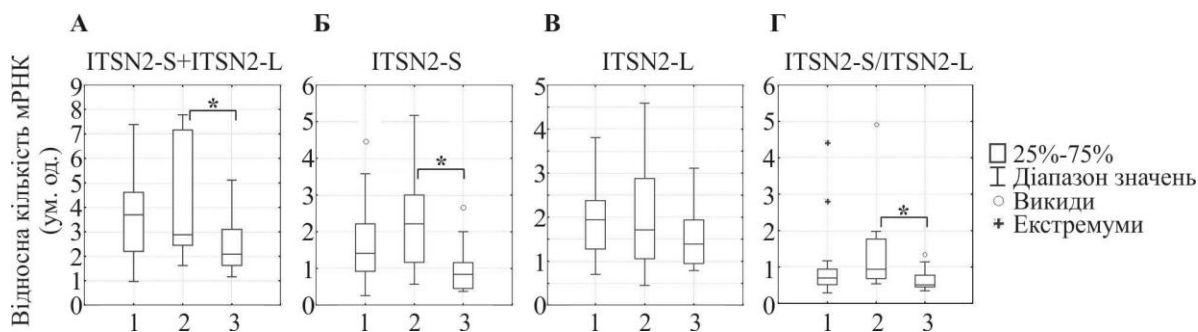


Рис. 1. Відносний вміст мРНК *ITSN2-S* та *ITSN2-L* в зразках пухлин молочної залози. 1 —  $ER^+PR^+HER2/neu^-$ ; 2 —  $ER^-PR^-HER2/neu^-$ ; 3 —  $ER^{+/-}PR^{+/-}HER2/neu^+$ ; А — вміст *ITSN2-S* та *ITSN2-L* разом; Б — вміст *ITSN2-S*; В — вміст *ITSN2-L*; Г — співвідношення *ITSN2-S/ITSN2-L*; \* —  $p < 0.05$ .

Достовірні відмінності в рівні експресії окремих ізоформ *ITSN2* в різних групах пухлин у проаналізованих зразках було виявлено лише для *ITSN2-S*. Найнижчий вміст *ITSN2-S* було виявлено в *HER2/neu*-позитивних пухлинах (0,38–2,0 ум. од., медіана — 0,69 ум. од.); найвищий — в пухлинах з тричі негативним статусом рецепторів (0,57–5,17 ум.од., медіана — 2,21 ум. од.) (рис. 1Б). Різниця у кількості *ITSN2-L* в досліджуваних групах пухлин виявлено не було (рис. 1В). Співвідношення *ITSN2-S/ITSN2-L* відображає загальну картину дослідження. Найменше співвідношення спостерігалось в *HER2/neu*-позитивних пухлинах у порівнянні з пухлинами з тричі негативним статусом рецепторів (рис. 1Г).

Нами було також проведено порівняння експресії мРНК ізоформ *ITSN2* в пухлинах пацієнок молодше та старше 55 років з наявністю чи відсутністю метастазів в лімфовузлах, що також є критерієм агресивності пухлин, проте залежності вмісту мРНК ізоформ *ITSN2* від віку пацієнок та від наявності метастазів у лімфовузлах виявлено не було (результати не представлено).

Таким чином, саме коротка ізоформа *ITSN2* може розглядатися як один з потенційних прогностичних маркерів у хворих на рак грудної залози. Наші результати показали, що саме коротка ізоформа *ITSN2* знижує свою експресію у зразках пухлин з поганим прогнозом перебігу захворювання, що корелює з раніше описаним

Specht і співроб. [10]. Цей результат є очікуваним оскільки саме довга ізоформа *ITSN2* з гуанозинобмінною активністю приймає участь в перебудовах актинового цитоскелету, що, в свою чергу, є важливою умовою для метастазування ракових клітин [14, 18].

Аналіз експресії мРНК довгої ізоформи *TKS5* в зразках пухлин молочної залози методом кількісної ЗТ-ПЛР. Представник родини *TKS* — *TKS5* є необхідним компонентом для утворення структур інвазивності ракових клітин — інвадоподій [18]. мРНК гену *TKS5* має ряд подій альтернативного сплайсингу, що впливають на структуру кінцевої білкової молекули. Експресія найдовшої з цих ізоформ (*TKS5-L*), що має домен зв'язування з мембранними фосфотидилінозитолфосфатами, корелює з метастазуванням аденокарциноми легенів [20]. Тому саме її ми взяли в наше дослідження для аналізу зразків пухлин молочної залози. Для порівняння експресії мРНК *TKS5-L* ми аналізували зразки пухлин молочної залози двох груп: перша містила 10 зразків пухлин з рецепторним статусом  $ER^+PR^+HER2/neu^-$  і мала гарний прогноз перебігу хвороби; друга група містила 10 зразків пухлин з рецепторним статусом  $ER^{+/-}PR^{+/-}HER2/neu^+$  і мала поганий прогноз перебігу хвороби. Результати ПЛР у реальному часі показали що *TKS5-L* не міняють суттєво свою експресію у пухлинах хворих на рак молочної залози із сприятливим ( $ER^+PR^+HER2/neu^-$ ) та несприятливим ( $ER^{+/-}PR^{+/-}HER2/neu^+$ ) прогнозами (рис. 2).

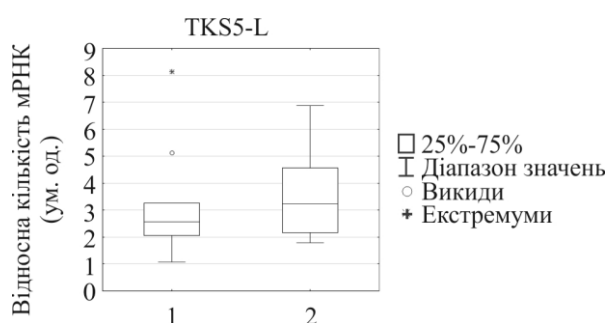


Рис. 2. Відносний вміст мРНК *TKS5-L* в зразках пухлин грудної залози. 1 —  $ER^+PR^+HER2/neu^-$ ; 2 —  $ER^{+/-}PR^{+/-}HER2/neu^+$ .

## Висновки

В результаті проведених нами досліджень на зразках пухлин молочної залози, отриманих в Національному інституті раку, ми виявили зниження експресії мРНК *ITSN2* у пухлинах з несприятливим діагнозом ( $ER^{+/-}PR^{+/-}HER2/neu^+$ ). Зниження експресії спостерігалось в загальній кількості ізоформ *ITSN2* та окремо короткої ізоформи (*ITSN2-S*). Це свідчить про можливість використання *ITSN2-S* в якості прогностичного маркера молочної залози. Достовірних відмінностей в експресії *ITSN2-L* та *TKS5-L* в аналізованих зразках виявлено не було.

## Перелік літератури

1. Dai X., Li Y., Bai Z., Tang X. Q. Molecular portraits revealing the heterogeneity of breast tumor subtypes defined using immunohistochemistry markers. *Sci Rep.* 2015. Vol. 5. P. 14499, doi: 10.1038/srep14499.
2. Tang Y., Wang Y., Kiani M. F., Wang B. Classification, Treatment Strategy, and Associated Drug Resistance in Breast Cancer. *Clin Breast Cancer.* 2016. Vol. 16, № 5. P. 335–343, doi: 10.1016/j.clbc.2016.05.012.
3. Pourteimoor V., Mohammadi-Yeganeh S., Parryan M. Breast cancer classification and prognostication through diverse systems along with recent emerging findings in this respect; the dawn of new perspectives in the clinical applications. *Tumour Biol.* 2016. Vol. 37, № 11. P. 14479–14499.
4. Leidy J., Khan A., Kandil D. Basal-like breast cancer: update on clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular features. *Arch Pathol Lab Med.* 2014. Vol. 138, № 1. P. 37–43, doi: 10.5858/arpa.2012-0439-RA.
5. Lam S. W., Jimenez C. R., Boven E. Breast cancer classification by proteomic technologies: Current state of knowledge. *Cancer Treat Rev.* 2014. Vol. 40, № 1. P. 129–138.
6. Eroles P., Bosch A., Pérez-Fidalgo J. A., Lluch A. Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat Rev.* 2012. Vol. 38, № 6. P. 698–707, doi: 10.1016/j.ctrv.2011.11.005.
7. Dai X., Xiang L., Li T., Bai Z. Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. *J Cancer.* 2016. Vol. 7, № 10. P. 1281–1294, doi: 10.7150/jca.13141.
8. Fusco N., Geyer F. C., De Filippo M. R. Martelotto L. G., Ng C. K., Piscuoglio S., Guerini-Rocco E., Schultheis A. M., Fuhrmann L., Wang L., Jungbluth A. A., Burke K. A., Lim R. S., Vincent-Salomon A., Bamba M., Moritani S., Badve S. S., Ichihara S., Ellis I. O., Reis-Filho J. S., Weigelt B. Genetic events in the progression of adenoid cystic carcinoma of the breast to high-grade triple-negative breast cancer. *Mod Pathol.* 2016. Vol. 29, № 11. P. 1292–1305, doi: 10.1038/modpathol.2016.134.

9. Schmidt M., Thomssen C., Untch M. Intrinsic Subtypes of Primary Breast Cancer — Gene Expression Analysis. *Oncol Res Treat.* 2016. Vol. 39, № 3. P. 102–110, doi: 10.1159/000444409.
10. Specht K., Harbeck N., Smida J., Annecke K., Reich U., Naehrig J., Langer R., Mages J., Busch R., Kruse E., Klein-Hitpass L., Schmitt M., Kiechle M. Expression profiling identifies genes that predict recurrence of breast cancer after adjuvant CMF-based chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat.* 2008. ol. 118. P. 45–56, doi: 10.1007/s10549-008-0207-y.
11. Pucharcos C., Casas C., Nadal M., Estivill X., de la Luna S. The human intersectin genes and their spliced variants are differentially expressed. *Biochim. Biophys. Acta.* 2001. Vol. 1521. P. 1–11.
12. Adams A., Thorn J. M., Yamabhai M., Kay B. K., O'Bryan J. P. Intersectin, an Adaptor Protein Involved in Clathrin-mediated Endocytosis, Activates Mitogenic Signaling Pathways. *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275, № 35. P. 27414–27420.
13. McGavin M. K., Badour K., Hardy L. A., Kubisecki T. J., Zhang J., Siminovitch K. A. The intersectin 2 adaptor links Wiskott Aldrich Syndrome protein (WASp)-mediated actin polymerization to T cell antigen receptor endocytosis. *J Exp Med.* 2001. Vol. 194. P. 1777–1787.
14. Tsyba L., Nikolaienko O., Dergai O., Dergai M., Novokhatska O., Skrypkina I., Rynditch A. Intersectin multidomain adaptor proteins: Regulation of functional diversity. *Gene.* 2011. Vol. 473. P. 67–75, doi: 10.1016/j.gene.2010.11.016.
15. Gryaznova T., Kropyvko S., Burdyniuk M., Gubar O., Kryklyva V., Tsyba L., Rynditch A. Intersectin adaptor proteins are associated with actin-regulating protein WIP in invadopodia. *Cell. Signal.* 2015. Vol. 27, № 7. P. 1499–1508, doi: 10.1016/j.cellsig.2015.03.006.
16. Staub E., Groene J., Heinze M., Mennerich D., Roepcke S., Klamann I., Hinzmann B., Castanos-Velez E., Pilarsky C., Mann B., Brümmendorf T., Weber B., Buhr H.-J., Rosenthal A. An expression module of WIPF1-coexpressed genes identifies patients with favorable prognosis in three tumor types. *J Mol Med.* 2009. Vol. 87. P. 633–644, doi: 10.1007/s00109-009-0467-y.
17. Murphy D. A., Courtneidge S. A. The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2011. Vol. 12, № 7, P. 413–426.
18. Courtneidge S. A. Cell migration and invasion in human disease: the Tks adaptor proteins. *Biochem. Soc. Trans.* 2012. Vol. 40, № 1. P. 129–132, doi: 10.1042/BST20110685.
19. Blouwa B., Sealsb D. F., Passa I. et al. A role for the podosome/invadopodia scaffold protein Tks5 in tumor growth *in vivo*. *European Journal of Cell Biology.* 2008. Vol. 87, № 8–9. P. 555–567, doi: 10.1016/j.ejcb.2008.02.008.
20. C. M. Li, Guoan Chen, T. L. Dayton, C. Kim-Kisela, S. Hoersch, C. A. Whittaker, R. T. Bronson, D. G. Beer, M. M. Winslow, T. Jacks. Differential Tks5 isoform expression contributes to metastatic invasion of lung adenocarcinoma. *Genes and Development.* 2013. Vol. 27. P.1557–1567, doi: 10.1101/gad.222745.113.
21. Drury S., Anderson H., Dowsett M. Selection of REFERENCE genes for normalization of qRT-PCR data derived from FFPE breast tumors. *Diagn. Mol. Pathol.* 2009. Vol. 18, № 2. P. 103–107, doi: 10.1097/PDM.0b013e31817c1ae2.
22. Lyng M. B., Laenkholm A. V., Pallisgaard N., Ditzel H. J. Identification of genes for normalization of real-time RT-PCR data in breast carcinomas. *BMC Cancer.* 2008. Vol. 22. P. 20, doi: 10.1186/1471-2407-8-20.
23. Radonic A., Thulke S., Mackay I. M., Landt O., Siegert W., Nitsche A. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004. Vol. 313. P. 856–862.

Представлено М. В. Дибковим  
Надійшла 22.05.2018

#### EXPRESSION ANALYSIS OF THE ITSN2 AND TKS5 MRNA ISOFORMS IN HUMAN MALIGNANT BREAST TUMORS

S. V. Kropyvko<sup>1</sup>, L. O. Tsyba<sup>1</sup>, O. V. Novokhatska<sup>1</sup>, L. A. Syvak<sup>2</sup>, T. Ye. Tarasenko<sup>2</sup>, A. N. Grabovoy<sup>2</sup>, A. V. Rynditch<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine  
150, Zabolotnogo str., 03143, Kyiv, Ukraine  
e-mail: s.v.kropyvko@imbg.org.ua

<sup>2</sup>The National Cancer Institute  
33/43, Lomonosova str., 03022, Kiev, Ukraine

**Aim.** Despite the great progress in cancer treating, the breast cancer remains lethal in 15 % cases. Regardless of the many years of research and extensive experience in the treatment of this type of cancer, one of the main problems in diagnosis and therapy is its high clinical and genetic heterogeneity. Thereby the identification of markers for personalized treatment of patients is still an actual issue. **Methods.** Collection of clinical material, RNA isolation, and expression analysis of ITSN2 and TKS5 isoforms using quantitative real time PCR with fluorescence-labeled probes. **Results.** We have found that ITSN2-S expression is reliably reduced in HER2/neu-positive tumors with poor prognosis. There were no significant differences in the expression of ITSN2-L and TKS5-L in the analyzed samples. **Conclusions.** These studies have demonstrated the possible use of ITSN2 short isoform (ITSN2-S) as a prognostic marker for breast cancer.

**Keywords:** breast cancer, ITSN2, TKS5, expression analysis.

## АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ИЗОФОРМ *ITSN2* И *TKS5* В ОПУХОЛЯХ ГРУДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА

С. В. Кропивко<sup>1</sup>, Л. А. Цыба<sup>1</sup>, О. В. Новохацкая<sup>1</sup>,  
Л. А. Сивак<sup>2</sup>, Т. Е. Тарасенко<sup>2</sup>, О. Н. Грабовой<sup>2</sup>,  
А. В. Рындич<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт молекулярной биологии  
и генетики НАН Украины  
Украина, Киев, 03143, ул. Заболотного, 150  
e-mail: s.v.kropyvko@imbg.org.ua

<sup>2</sup>Национальный институт рака  
Украина, Киев, 03022, ул. Ломоносова, 33/34

**Цель.** Несмотря на большой прогресс в лечении 15 % случаев рака молочной железы остаются летальными. Несмотря на многолетние исследования и большой опыт в лечении этого вида рака, одной из

основных проблем в диагностике и лечении есть его высокая клиническая и генетическая гетерогенность, поэтому выявление маркеров для персонализированного лечения больных является актуальным вопросом до сих пор. **Методы.** Сбор клинического материала, выделение РНК и анализ экспрессии изоформ *ITSN2* и *TKS5* с помощью количественного ПЦР в реальном времени используя флуоресцентно меченые зонды. **Результаты.** Мы обнаружили, что *ITSN2-S* достоверно понижает свою экспрессию в HER2/неи-позитивных опухолях с плохим прогнозом. Достоверных данных в экспрессии *ITSN2-L* и *TKS5-L* в анализированных образцах обнаружено не было. **Выводы.** Эти исследования показали возможность использования короткой изоформы *ITSN2* (*ITSN2-S*) как прогностического маркера этого заболевания.

**Ключевые слова:** рак молочной железы, *ITSN2*, *TKS5*, анализ экспрессии.