

Placental-specific protein 1 (PLAC1) gene expression profile in new diagnosed Chronic myeloid leukemia (CML) and Chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients

Parasto Gholami¹, Sarvin Bagheralmoosavi¹, Shirin Kian Ersi², Mohammad Hojjat-Farsangi³, Sina Salari², Marjan Yaghmaie⁴, Jafar Mahmoudian⁵, Mahmood Jeddi-Tehrani⁵, Hossein Asgarian-Omran⁶, Amirhasan Zarnani⁷, Mahdi Shabani^{1*}

1. Department of Immunology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2. HSCT Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

3. The Persian Gulf Marine Biotechnology Medicine Research Center, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran

4. Hematology, Oncology and Stem cell Transplantation Research enter, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

5. Monoclonal Antibody Research Center, Avicenna Research Institute, ACECR, Tehran, Iran

6. Department of Immunology, School of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

7. Department of Immunology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received: 2020/01/18

Accepted: 2020/09/15)

Abstract

Purpose: Placenta-specific protein 1 (PLAC1) is one of the members of cancer-testis antigens family that has limited expression in normal tissue, but is upregulated in a variety of malignant tissues. Considering the lack of studies on the expression of FCRL1 in CML and CLL, the current study was conducted to examine the expression pattern of PLAC1 gene in these leukemias.

Materials and Methods: Fresh peripheral blood samples were collected from 6 CML and 10 CLL patients. In addition, peripheral blood samples of 10 healthy individuals were collected in EDTA as control group. All patients and healthy individuals signed a consent letter before sampling. The mononuclear cells were separated using ficoll-hypaque gradient centrifugation. Isolated mononuclear cells were used for RNA extraction and cDNA synthesis using RT-PCR method. Then, PLAC1 transcript expression in comparison to GAPDH were detected via Real-Time PCR. The statistical analyses were performed using chi-square test in SPSS.

Results: All 10 normal samples were negative for PLAC1. The PLAC1 expression was found to be statistically different in CML group (4 out of 6 cases) compared with that in the normal group (P value = 0.000). However, CLL revealed no significant difference compared to normal individuals for PLAC1 expression (P Value = 0.648). In a significant percentage of CML patients, PLAC1 expression was positive but in CLL patients PLAC1, transcript expression was not evident.

Conclusion: It seems that PLAC1 could potentially be proposed as a biomarker in CML to aid in the diagnosis, prognosis, and treatment in the future.

Keywords: Gene expression pattern; Placenta specific protein 1 antigen; Chronic myeloid leukemia; Chronic lymphocytic leukemia

*Corresponding author: Mahdi Shabani

Email: msshabani@sbmu.ac.ir

بررسی الگوی بیان آنتی ژن پروتئین اختصاصی جفتی ۱ (Placenta-specific protein 1; PLAC1) در بیماران مبتلا به لوسمی میلوپیدی مزمن و لوسمی لنفوسیتی مزمن تازه تشخیص

پرستو غلامی^۱، سروین باقرالموسوی^۱، شیرین کیان ارثی^۲، محمد حجت فرسنگی^۳، سینا سالاری^۲، مرجان یغمایی^۴،

جعفر محمودیان^۵، محمود جدی تهرانی^۶، حسین عسگریان عمران^۱، امیرحسین زرنانی^۷، مهدی شعبانی^{۱*}

۱. گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
۲. مرکز تحقیقات پیوند سلول های بنیادی خونساز، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
۳. مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دریایی خلیج فارس، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران.
۴. مرکز تحقیقات هماتولوژی، انکولوژی و پیوند مغز استخوان، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
۵. مرکز تحقیقات آنتی بادی منوکلونال، پژوهشگاه ابن سینا جهاد دانشگاهی، تهران، ایران.
۶. گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران.
۷. گروه ایمونولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

پذیرش: ۱۳۹۹/۶/۲۵

دریافت: ۹۸/۱۰/۲۸

چکیده:

سابقه و هدف: آنتی ژن اختصاصی جفتی ۱ (PLAC1) از دسته مارکرهایی میباشد که بیان بالا بر سطح طیف گسترده ای از تومورهای انسانی و بیان محدود در بافتهای نرمال دارد. با توجه به فقدان مطالعات بیان PLAC1 در CML و CLL، تشویق شدیم تا به بررسی الگوی بیان ژن PLAC1 در بیماری های ذکر شده بپردازیم.

مواد و روش ها: نمونه های خون محیطی ۶ بیمار CML و ۱۰ بیمار CLL جمع آوری شد. به علاوه نمونه های خون محیطی ۱۰ فرد نرمال به همراه EDTA گرفته شد. تمام بیماران و افراد سالم قبل از نمونه گیری فرم رضایت نامه را امضا نمودند. سلولهای تک هسته ای آنها با روش فایکول جداسازی شد. سلولهای تک هسته ای جدا شده برای استخراج RNA و سنتز cDNA با روش RT-PCR استفاده گردیدند. بیان ژن PLAC1 در مقایسه با ژن GAPDH در افراد بیمار و کنترل با Real-Time PCR بررسی شد. نتایج حاصله با نرم افزار SPSS و تست chi-square آنالیز آماری شد.

یافته ها: تمامی 10 نمونه نرمال PLAC1 منفی بودند. در گروه CML (مورد 4) در مقایسه با کنترل تفاوت معنی داری مشاهده شد (P-value=0.000). در حالی که گروه CLL (مورد 1 از 01 مورد) با کنترل، از نظر آماری اختلاف معناداری مشاهده نشد (P-Value=0.648). درصد قابل توجهی از CML بیان PLAC1 مثبت بود ولی در CLL بیان PLAC1 مشهود نبود.

یافته ها: PLAC1 در CML، به عنوان یک بیومارکر می تواند بصورت بالقوه به عنوان مارکری برای کمک به تشخیص، پیش آگهی و درمان در آینده مطرح شود.

نتیجه گیری: به نظر می رسد PLAC1 در بیماران CML، به عنوان یک بیومارکر می تواند با نتایج تکمیلی به صورت بالقوه به عنوان مارکری برای کمک به تشخیص، پیش آگهی و درمان بیماران لوسمیک در آینده مطرح شود.

واژگان کلیدی: الگوی بیان ژن، آنتی ژن پروتئین اختصاصی جفتی ۱، لوسمی میلوپیدی مزمن، لوسمی لنفوسیتی مزمن

مقدمه:

لوسمی میلوپیدی مزمن (CML)، یک بدخیمی کلونال سلول های بنیادی خون ساز است که علاوه بر افزایش سلول های رده میلوپیدی منجر به افزایش سلول های رده اریترئیدی و پلاکت ها نیز در خون محیطی می شود (۱، ۲). علی رغم تمامی پیشرفت های انجام شده در رویکردهای درمانی، نیاز به درمان های جدید در CML مقاوم به درمان یا عود کننده که وارد فاز پیشرونده بیماری می شود، بیش از پیش حس می شود، لذا شناسایی بیومارکر جدید با بیان اختصاصی بر سطح سلول های بدخیم و عدم بیان بر سطح سلول های نرمال می تواند در این راه کمک کننده باشد.

نویسنده مسئول: مهدی شعبانی

پست الکترونیک: msshabani@sbmu.ac.ir

سایبرگرین، یکتا تجهیز آزما) و ۱ میکرولیتر cDNA انجام شد. برنامه دمایی و زمانی برای دستگاه تعریف گردید و دستگاه شروع به تکثیر نمونه ها کرده و پس از اتمام کار، داده ها را نمایش داد. پس از انجام واکنش، داده های خام به صورت Ct از دستگاه استخراج گردید و اندازه گیری میزان بیان با روش $\Delta \Delta Ct$ انجام شد. پس از انجام واکنش Real-time PCR، به منظور اطمینان از تکثیر محصول اختصاصی از تکنیک الکتروفورز بر روی ژل آگاروز استفاده گردید.

جدول ۱: پرایمرهای استفاده شده به منظور تکثیر ژن های PLAC1 و

GAPDH

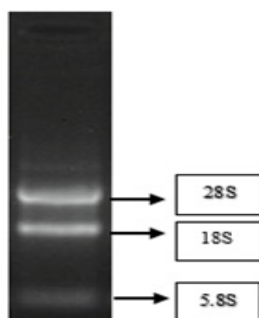
نام پرایمر	سکانس پرایمرهای استفاده شده
GAPDH forward	۳'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-۵'
GAPDH reverse	۳'-GAAGATGGTGTGGGATTTTC-۵'
PLAC1 forward	۳'-GTGAGCACAAAGCCACATTTTC-۵'

روش های آماری:

آنالیز آماری داده ها با استفاده از نرم افزارهای excel و spss انجام گردید. در این بررسی از آزمون آماری دقیق فیشر استفاده شد.

یافته ها:

کیفیت RNA استخراج شده از نظر یکپارچگی آن با الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ تایید شد (شکل ۱).



شکل ۱: تصویر ژل مربوط به RNA استخراج شده از سلول های تک هسته ای خون محیطی نمونه بیمار CML

تکثیر اختصاصی محصول ژن های GAPDH و PLAC1، با تکنیک الکتروفورز از نظر سایز تایید گردید (شکل های ۲ و ۳). همان طور که در شکل ها مشاهده می شود، محصولات مربوط به هر دو ژن GAPDH و PLAC1 به طور اختصاصی تکثیر شده است و در کنار DNA مارکر ۱۰۰ جفت بازی، قطعات ۲۲۶ جفت بازی مربوط به ژن GAPDH و ۱۱۸ جفت بازی مربوط به ژن PLAC1 نشان داده شده است. برای مقایسه های کیفی در تمامی نمونه های مورد مطالعه بر اساس منحنی تکثیر Real-Time PCR، هر کدام از نمونه ها که $CT \geq 33$ نشان دادند، به عنوان بیان مثبت از PLAC1 و موارد با $CT \leq 33$ به عنوان بیان منفی در نظر گرفته شد.

بررسی بیان با استفاده از آزمون آماری دقیق فیشر، نشان دهنده تفاوت معنی دار ($P \text{ value} = 0.000$) بین بیان ژن PLAC1 در گروه بیماران CML نسبت به گروه کنترل می باشد. بین بیان ژن PLAC1 در گروه بیماران CLL و گروه کنترل، از نظر آماری ارتباط معناداری مشاهده نشد ($P \text{ value} = 0.648$).

بیان PLAC1 در بیماران CML، ۶۶/۶٪ و در بیماران CLL، ۱۰٪ مشاهده گردید. هم چنین افراد نرمال از نظر بیان ژن PLAC1 منفی بودند (نمودار ۱). بیان ژن PLAC1 بین دو گروه لوسمی های مزمن با یکدیگر بررسی گردید

نرمال محدود به تروفوبلاست جفت به میزان بیشتر و سلول های زایای بیضه به میزان کمتر است، ولی به طور نا به جایی در طیف وسیعی از سرطان های انسانی بیان می شود (۵). امروزه بیان ژن PLAC1 در سرطان های مختلف به ویژه سرطان پروستات و سرطان پستان مورد توجه محققین واقع شده است (۵-۱۰). به دنبال مطالعات انجام شده، از آنجایی که بیان ژن PLAC1 در بدخیمی های هماتولوژیک تاکنون بررسی نشده است، هدف از انجام این مطالعه، بررسی بیان ژن PLAC1 در بدخیمی های خونی تحت عنوان CML و CLL است تا امکان استفاده بالقوه کمک به تشخیص، غربالگری و درمان را در آینده فراهم آورد.

مواد و روش ها:

در مطالعه مورد-شاهدی در خلال سال های ۱۳۹۷-۱۳۹۸ بیماران مراجعه کننده به بیمارستان شریعی تهران پس از تشخیص توسط متخصص و قبل از انجام هرگونه درمانی و با امضای رضایت نامه اخذ شد و افراد سالم نرمال بطور داوطلبانه در این بررسی شرکت نمودند. نمونه های تازه خون محیطی ۶ بیمار تازه تشخیص CML و نمونه ۱۰ بیمار تازه تشخیص مبتلا به لوسمی لنفوسیتی مزمن (CLL) مراجعه کننده به بیمارستان شریعی وابسته به دانشگاه علوم پزشکی تهران جمع آوری شد. که در مطالعه گذشته تهیه شده بود در این مطالعه استفاده شد. به علاوه نمونه های خون محیطی ۱۰ فرد نرمال به همراه EDTA گرفته شد. بیماران و افراد سالم در این بررسی در گروه های سنی یکسانی در نظر گرفته شدند. جداسازی سلول های تک هسته ای خون محیطی و استخراج RNA سلول های تک هسته ای خون محیطی بیماران CLL، CML و افراد سالم نرمال با روش فایکول جداسازی سلول های تک هسته ای جدا شده در محلول Trizol لیز شدند و با استفاده از کلروفرم سرد و به کمک میکروسانتریفیوژ در دمای ۴ درجه سانتیگراد کل RNA سلولها جدا گردید (روش گوانیدین ایزوتیوسیانات، فنول، کلروفرم). سپس به RNA جدا شده ایزوپروپانول سرد اضافه نموده وبعد از سانتریفیوژ، به رسوب حاصله اتانول ۷۵٪ سرد افزوده و مجددا سانتریفیوژ انجام شد. محلول رویی را خارج ساخته و لوله ها در دمای اتاق (۱۰ تا ۱۵ دقیقه) کاملاً خشک شدند. سپس به آن آب مقطر استریل دیونیزه حاوی diethyl pyrocarbonate (DEPC) افزوده و محلول RNA سریعاً به منظور سنتز cDNA استفاده شد. غلظت نمونه های RNA در ۲۶۰ OD با Nano dropl بررسی شده است. یکپارچگی RNA استخراج شده از طریق الکتروفورز در ژل آگاروز ۱/۵٪ و خلوص RNA نیز از طریق بررسی نسبت OD۲۸۰/OD۲۶۰ بررسی گردید.

سنتز cDNA

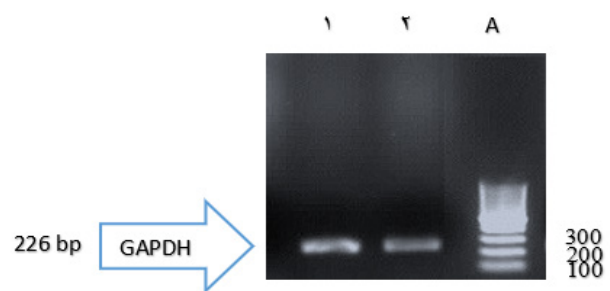
سنتز cDNA به فرآیندی گفته می شود که طی آن با فعالیت آنزیم رونوشت بردار معکوس از روی رشته mRNA، رشته cDNA ساخته می شود. برای سنتز cDNA از روی RNA، از آنزیم Reverse Transcriptase، پرایمرهای تصادفی شش نوکلئوتیدی (N6; random hexamer) و مواد مورد نیاز دیگر استفاده شد. پس از سنتز cDNA در دمای ۴۰ درجه، به منظور غیر فعال کردن آنزیم RT میکروتیوب ها به مدت ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتیگراد قرار داده شدند (۱۱). cDNA سنتز شده در فریزر -۲۰ درجه سانتی گراد برای استفاده های بعدی ذخیره گردید.

سنجش بیان نسبی ژن PLAC1 در نمونه خون محیطی بیماران مبتلا به CLL و CML و گروه کنترل با روش Real-Time PCR

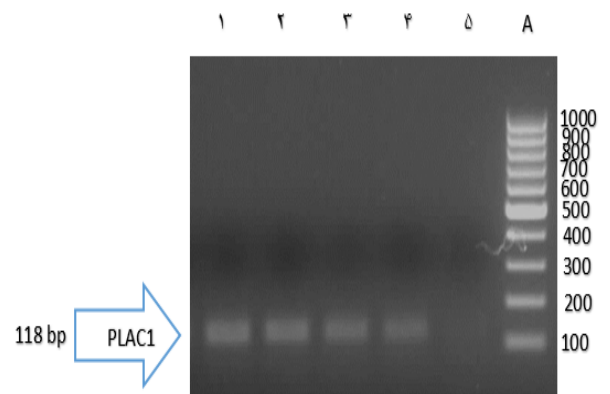
پرایمرهای اختصاصی PLAC1 به کمک پایگاه های اطلاعاتی و نرم افزارهای موجود به منظور استفاده در تکنیک Real-time PCR با روش سایبر گرین، طراحی، سفارش و سنتز شدند (جدول زیر). بیان نسبی PLAC1 در مقایسه با GAPDH بررسی گردید. مواد مورد نیاز برای انجام واکنش شامل PCR master mix، پرایمر forward و reverse و cDNA است. این مرحله در حجم ۲۰ میکرولیتر، شامل ۸/۲ میکرولیتر آب مقطر (ddw)، ۰/۴ میکرولیتر پرایمر forward، ۰/۴ میکرولیتر پرایمر reverse، ۱۰ میکرولیتر master mix

ندارند، از الزامات مطالعه در مبحث ایمونوترابی سرطان است. هم چنین شناسایی این ژن ها به پیشرفت تشخیص و روش های درمانی از جمله ایمونوترابی تومور کمک خواهد کرد. PLAC1 ملکولی از خانواده Cancer Testis Antigen ها است که در بافت جفت و بیضه بیان می شود ولی بر اساس گزارش های منتشر شده از مطالعات، در بافت های نرمال بیان نمی شود (۱۲). در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۷ توسط Wilson A. Silva Jr. و همکارانش صورت گرفت، الگوی بیان PLAC1 در بافت های نرمال و انواع سرطان های مختلف مقایسه و بررسی شد و به دنبال مشاهده افزایش بیان PLAC1 در انواع سرطان های مختلف به ویژه سرطان ریه، هدف قرار دادن PLAC1 برای اهداف درمانی از قبیل واکسن و مونوکلونال آنتی بادی به دلیل قرارگیری آن در سطح سلول پیشنهاد شد (۱۲). در مطالعه ای در کارسینوم هیپاتوسلولار، Xue-Yuan Dong و همکارانش نشان دادند که PLAC1 به میزان زیادی در بافت سرطان هیپاتوسلولار بیان می شود و در سرم بیماران مبتلا آنتی بادی علیه آن وجود دارد. لذا PLAC1 یک آنتی ژن خاص تومور است که ممکن است کاربرد های بالینی بارزگی در رویکردهای درمانی داشته باشد (۹). در مطالعه ای که توسط Nana E. Tchabo و همکارانش بر روی سرطان اپیتلیال تخمدان صورت گرفت، نشان دادند که PLAC1 و DPPA2 در زمره آنتی ژن های بیضه ای-سرطانی (CTA) بوده که بیان آنها محدود به سلول های زایا است ولی در انواعی از تومورهای بدخیم نیز بیان می شوند. بیان این ها در سرطان تخمدان به ترتیب ۲۱٪ و ۳۱٪ است. همچنین بین بیان PLAC1 و DPPA2 و نتایج بالینی ارتباطی وجود دارد و هر دو این مارکرها می توانند اهداف درمانی به منظور ایمونوترابی سرطان اپیتلیال تخمدان واقع شوند (۱۰). در مطالعه ای که توسط Roya Ghods و همکارانش در بررسی الگوی بیان ژن PLAC1 در آدنوکارسینومای پیشرفته پروستات انجام گرفت، نتایج حاکی از آن بود که در سرطان پروستات، با افزایش بیان PLAC1، بیان PSA (prostate specific antigen) کاهش می یابد، در نتیجه PLAC1 می تواند به عنوان هدف درمانی مناسبی برای بیماران مبتلا به سرطان پروستات به ویژه آن هایی که در مراحل پیشرفته بیماری بودند، اتخاذ گردد (۶). در مطالعه ای که توسط Fangfang Liu و همکارانش بر روی آدنوکارسینومای معده مطرح شد، PLAC1 به عنوان یک بیومارکر بالقوه در تشخیص و درمان آدنوکارسینومای معده مطرح شد (۱۳). در مطالعه ای بر روی سرطان پستان که توسط Hongyan Yuan و همکارانش صورت گرفت، PLAC1 به عنوان بیومارکری در سرم ۶۰٪ بیماران مبتلا به سرطان پستان تشخیص داده شد به این امید که در آینده بتواند مارکر تشخیصی و درمانی برای بیماران مبتلا به سرطان پستان مطرح شود (۱۴). در مطالعه ای دیگر در سرطان پستان، Yongfei Li و همکارانش با مطالعه نقش PLAC1 نشان دادند که دنبال میانکنش PLAC1 با Furin، دومن داخل سلولی فاکتور نسخه برداری Notch1 تحت عنوان NICD فعال شده و بیان تومور ساپرسور PTEN را مهار می کند، که این مسیر پیام رسانی به نفع تومور بوده و منجر به پیشرفت و تکثیر و متاستاز تومور می گردد. لذا، بیان بالای PLAC1 در سرطان پستان با پیش آگهی بد بیمار، مهاجرت و تهاجم تومور همراه است. بنابراین، PLAC1 می تواند به عنوان هدف درمان و مارکر پیش آگهی در بیماران مبتلا به سرطان پستان واقع شود (۱۵). در مطالعه ای که توسط Qiongshu Li و همکارانش در بررسی هدف قرار دادن PLAC1 در سرطان پستان انجام دادند، موفق به ساخت سلول های T مهندسی ژنتیک شده علیه PLAC1 (سلول های CAR-T-PLAC1) به منظور ایمونوترابی سرطان پستان شده اند (۱۶).

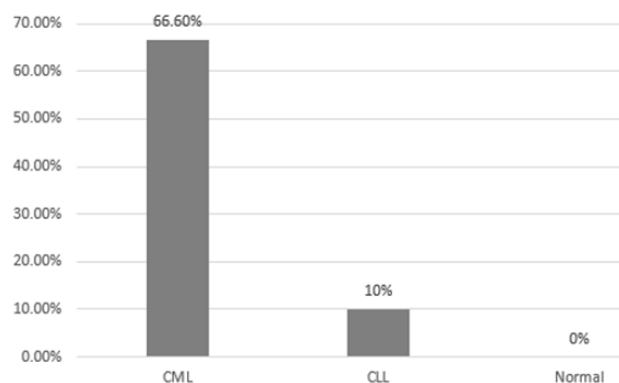
با توجه به عدم بیان PLAC1 در نمونه های نرمال و بیان قابل توجه آن در بیماران CML می توان PLAC1 را به عنوان یک آنتی ژن اختصاصی تومور یا آنتی ژن وابسته به تومور معرفی کرد که به نظر می رسد در درصدی از لوسمی ها بیان مثبتی دارد، بنابراین ملکول PLAC1 می تواند به صورت بالقوه یک آنتی ژن وابسته به توموری باشد که در پاتولوژی لوسمی ها دخالت دارد که باید این نقش PLAC1 در مطالعات تکمیلی بررسی گردد. ملکول PLAC1 با توجه به این درصد بیان در بیماری CML، می تواند به عنوان کمکی برای تشخیص، پیش آگهی و درمان این لوسمی باشد. لازم به ذکر است که تعداد نمونه های مورد مطالعه بسیار اندک بود که نیازمند جمع آوری و آنالیز تعداد بیشتری نمونه



شکل ۲: تصویر ژل مربوط به محصولات Real-Time PCR ژن GAPDH تعدادی از نمونه های مورد مطالعه بر روی ژل آگارز ۱/۵٪
A: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ۲: محصول تکثیر ژن GAPDH (۲۲۶ جفت باز) مربوط به نمونه ها



شکل ۳: تصویر ژل مربوط به محصولات Real-Time PCR ژن PLAC1 تعدادی از نمونه های مورد مطالعه بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ A: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ۱ و ۲ و ۳ و ۴ و ۵: محصول تکثیر ژن PLAC1 (۱۱۸ جفت باز) مربوط به نمونه ها



نمودار ۱: درصد حضور مارکر PLAC1 در نمونه های مورد مطالعه

که این مقایسه از نظر آماری معنادار نگردید (P value = ۰,۲۵۶). هم چنین متغیرهایی هم چون سن و جنس نیز با میزان بیان ژن PLAC1 در گروه های مورد مطالعه بررسی شدند که از نظر آماری تفاوت معنادار نبود (P value = ۰,۸۵۶).

بحث:

تحقیق نشان داد که در لوسمی های در لوسمی های CML و CLL، بیان رونوشت PLAC1 به میزان ۶۰٪ در CML دیده می شود ولی در CLL چندان مشهود نیست، که تایید هر دو نتیجه نیازمند بررسی بر روی تعداد بیشتری نمونه می باشد. هم چنین بیان رونوشت PLAC1 در افراد نرمال سالم بررسی گردید و در هیچ یک از افراد نرمال بیان رونوشت PLAC1 مشاهده نشد، که تاییدی بر عدم بیان ملکول PLAC1 در بافت های نرمال به غیر از جفت و بیضه می باشد (۱۲). شناسایی ژن هایی که در تومورها بیان می شوند و بیانی در بافت های نرمال

درمان و حتی میزان بیان آن در سلول های لوسمیک، می تواند به عنوان هدفی برای درمان با استفاده از آنتی بادی و یا سلول درمانی قرار بگیرد. مطالعات تکمیلی در تعداد بیشتری نمونه در هر گروه لوسمی، به منظور نتایج قوی تر پیشنهاد می شود.

تشکر و قدردانی:

مقاله حاضر حاصل از پایان نامه ی دانشجویی کارشناسی ارشد ایمنی شناسی پزشکی و طرح مصوب به شماره ۲۸۰۵۱ دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی می باشد.

منابع:

1. Cortes J, Kantarjian H. Beyond chronic myelogenous leukemia: potential role for imatinib in Philadelphia-negative myeloproliferative disorders. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*. 2004;100(10):2064-78.
2. Sawyers CL. Chronic myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*. 1999;340(17):1330-40.
3. Caligaris-Cappio F. Biology of chronic lymphocytic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol*. 2000;4(1):5-21.
4. D'Arena G, Di Renzo N, Brugiattelli M, Vigliotti ML, Keating MJ. Biological and clinical heterogeneity of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2003;44(2):223-8.
5. Fant M, Farina A, Nagaraja R, Schlessinger D. PLAC1 (Placenta-specific 1): a novel, X-linked gene with roles in reproductive and cancer biology. *Prenat Diagn*. 2010;30(6):497-502.
6. Ghods R, Ghahremani MH, Madjd Z, Asgari M, Abolhasani M, Tavasoli S, et al. High placenta-specific 1/low prostate-specific antigen expression pattern in high-grade prostate adenocarcinoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2014;63(12):1319-27.
7. Koslowski M, Sahin U, Mitnacht-Kraus R, Seitz G, Huber C, Tureci O. A placenta-specific gene ectopically activated in many human cancers is essentially involved in malignant cell processes. *Cancer Res*. 2007;67(19):9528-34.
8. Wagner M, Koslowski M, Paret C, Schmidt M, Tureci O, Sahin U. NCOA3 is a selective co-activator of estrogen receptor alpha-mediated transactivation of PLAC1 in MCF-7 breast cancer cells. *BMC Cancer*. 2013;13:570.
9. Dong XY, Peng JR, Ye YJ, Chen HS, Zhang LJ, Pang XW, et al. Plac1 is a tumor-specific antigen capable of eliciting spon-

aneous antibody responses in human cancer patients. *Int J Cancer*. 2008;122(9):2038-43.
- 10. Tchabo NE, Mhawech-Fauceglia P, Caballero OL, Vilella J, Beck AF, Miliotto AJ, et al. Expression and serum immunoreactivity of developmentally restricted differentiation antigens in epithelial ovarian cancer. *Cancer Immun*. 2009;9:6.
- 11. Shabani M, Asgarian-Omran H, Vossough P, Sharifian RA, Faranoush M, Ghragozlou S, et al. Expression profile of orphan receptor tyrosine kinase (ROR1) and Wilms' tumor gene 1 (WT1) in different subsets of B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2008;49(7):1360-7.
- 12. Silva WA, Jr., Gnjjatic S, Ritter E, Chua R, Cohen T, Hsu M, et al. PLAC1, a trophoblast-specific cell surface protein, is expressed in a range of human tumors and elicits spontaneous antibody responses. *Cancer Immun*. 2007;7:18.
- 13. Liu F, Shen D, Kang X, Zhang C, Song Q. New tumor antigen PLAC1/CP1, a potentially useful prognostic marker and immunotherapy target for gastric adenocarcinoma. *J Clin Pathol*. 2015;68(11):913-6.
- 14. Yuan H, Chen V, Boisvert M, Isaacs C, Glazer RI. PLAC1 as a serum biomarker for breast cancer. *PLoS One*. 2018;13(2):e0192106.
- 15. Li Y, Chu J, Li J, Feng W, Yang F, Wang Y, et al. Cancer/testis antigen-Plac1 promotes invasion and metastasis of breast cancer through Furin/NICD/PTEN signaling pathway. *Mol Oncol*. 2018;12(8):1233-48.
- 16. Li Q, Liu M, Wu M, Zhou X, Wang S, Hu Y, et al. PLAC1-specific TCR-engineered T cells mediate antigen-specific antitumor effects in breast cancer. *Oncol Lett*. 2018;15(4):5924-32.