

Анализ аллельного дисбаланса при глиобластоме: новые хромосомные участки потери гетерозиготности и новые гены-кандидаты*

Алексеева Е.А.^{1,2}, Танас А.С.^{1,2,3}, Прозоренко Е.В.⁴, Зайцев А.М.⁵,
Кирсанова О.Н.⁵, Самарин А.Е.⁵, Залетаев Д.В.^{1,2,3}, Стрельников В.В.^{1,2,3}

¹ — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Медико-генетический научный центр» Российской академии медицинских наук, Москва, 115478, ул. Москворечье, д.1, e-mail: vstrel@list.ru

² — Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 119991, ул. Трубецкая, д.8, стр.2, e-mail: tanas80@gmail.com

³ — Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 117997, ул. Островитянова, д.1, e-mail: zalnem@mail.ru

⁴ — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский онкологический центр им. Н.Н. Блохина» Российской академии медицинских наук, Москва, 115478, Каширское ш., д.24, e-mail: prozorenko1984@mail.ru

⁵ — Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена, Москва, 125284, 2-й Боткинский пр., д.3, e-mail: azaitsev_nsi@mail.ru;

Путём микросателлитного анализа исследовано одиннадцать хромосомных локусов, в которых прежде не было описано случаев аллельного дисбаланса при глиобластоме. В двух локусах из одиннадцати — 18q11.2 и 21q21.1 — не выявлено случаев аллельного дисбаланса в выборке из 108 образцов глиобластомы. Однако в большинстве исследованных участков — 2q31.2, 3p25.1, 5q14.3, 6p21.1, 7q21.2, 9q21.33, 12q21.33, 16p13.12 и 19p13.2 — выявлены случаи аллельного дисбаланса с частотами 5,0%, 19,0%, 11,1%, 3,8%, 28,6%, 3,6%, 5,9%, 9,6% и 17,0% соответственно, что говорит об актуальности продолжения изучения глиобластомы на молекулярно-генетическом уровне. Для контроля репрезентативности выборки исследованы два хромосомных локуса: 8q21.3 и 14q13.3, для которых ранее было описано явление потери гетерозиготности при глиобластоме. Частоты аллельного дисбаланса по 8q21.3 и 14q13.3 в настоящем исследовании составили 15,8% и 42,3% соответственно, что совпадает с результатами других авторов. В работе рассматриваются потенциальные гены-кандидаты, расположенные в новых хромосомных локусах, для которых выявлен аллельный дисбаланс при глиобластоме.

Ключевые слова: глиобластома, аллельный дисбаланс, потеря гетерозиготности, гены-кандидаты

Введение

Глиобластома — наиболее частая и агрессивная первичная опухоль головного мозга. Она составляет около 80% первичных злокачественных новообразований центральной нервной системы у взрослого населения.

Несмотря на относительно низкую распространённость глиобластомы (около 1% от злокачественных новообразований среди взрослого населения), смертность и инвалидизация от этой опухоли имеют очень высокие показатели [6, 9].

За последние десятилетия были достигнуты значительные успехи в диагностике и лечении глиобластомы, однако в большинстве случаев опухоль оказывается, в конечном счёте, устойчивой к применяемой терапии и неизбежно рецидивирует.

Таким образом, прогноз для пациентов с такой опухолью по-прежнему остается неутешительным, средняя выживаемость составляет 12—14 мес. от постановки диагноза [9, 15].

Глиобластома достаточно хорошо изучена на молекулярном уровне и характеризуется большим числом генетических и эпигенетических изменений. Этиопатогенез опухоли представляется каскадом событий, вовлекающим ряд онкогенов и генов-супрессоров опухолевого роста [1, 26].

Тем не менее, только небольшое число из выявленных изменений при глиобластоме, такие как мутации в гене *IDH1* и метилирование промотора гена *MGMT*, используется в клинической практике в качестве маркёров прогноза течения заболевания и ответа на терапию [2].

Следовательно, на сегодняшний день существует острая необходимость в более глубоком изучении глиобластомы на молекулярно-генетическом уровне для лучшего понимания изменений, лежащих в основе развития этого злокачественного новообразования, что позволит идентифицировать мишени для разработки новых терапевтических средств, а также выявить потенциальные маркёры прогноза течения заболевания и ответа на терапию [15].

* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №14-04-31832 мол_а

Одним из эффективных способов изучения злокачественных опухолей на молекулярно-генетическом уровне является анализ аллельного дисбаланса геномных локусов — ситуации, при которой изменяется нормальное соотношение аллелей за счёт потери или увеличения копий одного из них [14]. Участки дисбаланса, во-первых, содержат гены-кандидаты, которые вовлечены в развитие заболевания, а, во-вторых, сами по себе могут являться молекулярными маркерами [3]. Так, Cairncross с соавторами показали, что сочетанная потеря гетерозиготности генов хромосом 1p и 19q является маркером чувствительности к химиотерапии и высокой безрецидивной выживаемости после химиотерапии в группе больных с олигодендроглиомой [7].

С помощью различных подходов, таких как флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH), сравнительная геномная гибридизация, SNP-анализ и микросателлитный анализ, было обнаружено большое число локусов с аллельным дисбалансом при глиобластоме. Выявлены участки как с увеличением копийности аллелей (1p34-36, 1p32, 3q26-28, 5q, 7q31, 8q24, 11q, 12q13, 13q, 15p15, 17q22-25, 19q, 20p, 20q), так и с потерей одного из аллелей (3q25-26, 4q, 6q26-27, 9p, 10p, 10q, 11p, 11q, 12q22, 13q, 14q13, 14q23-31, 15q13-21, 17q11-13, 18q22-23, 19q, 22q) [4, 11, 20, 23]. Некоторые из локусов с аллельным дисбалансом содержат известные онкогены и гены-супрессоры, другие локусы до сих пор остаются неописанными [23].

Нами проведено исследование аллельного дисбаланса с использованием микросателлитного анализа хромосомных локусов, изменения в которых ранее не были описаны при глиобластоме. Работа была направлена на поиск микросателлитных повторов, находящихся в участках хромосом, сохраняющих свою копийность в глиобластомах. Такие повторы могут быть использованы в качестве эндогенных контролей при изучении копийности ДНК методом количественного микросателлитного ПЦР-анализа в реальном времени [12, 22]. Как показывают результаты настоящего исследования, недостаточная изученность копийности хромосомных участков в глиобластомах делает задачу поиска областей конститутивно нормальной копийности далеко нетривиальной, поскольку не описанные ранее участки генома могут характеризоваться довольно выраженными частотами потери гетерозиготности, ассоциированной с глиобластомой.

Материалы и методы

Выбор микросателлитных маркеров. При выборе микросателлитных маркеров, которые могут использоваться в качестве эндогенных контролей копийности ДНК в глиобластомах при количественном микросателлитном ПЦР-анализе в реальном времени применяли два критерия:

1) микросателлитный повтор должен находиться в хромосомном сегменте, для которого ранее не описана потеря гетерозиготности при глиобластоме;

2) повтор должен иметь структуру (CA)_n, где $n > 14$, причём структура повтора должна быть совершенной на всем протяжении и не содержать перебивков.

В соответствии с этими критериями, при выборе микросателлитных маркеров для исследования на первом этапе были отобраны целые сегменты или даже плечи отдельных хромосом. На втором этапе, с использованием доступных баз данных Калифорнийского университета Santa Cruz (<http://genome.ucsc.edu>) на выбранных геномных участках идентифицировали микросателлитные повторы, полностью удовлетворяющие второму критерию отбора.

Клинический материал. Образцы глиобластомы и периферической крови получены от 108 больных с глиобластомой, оперированных в ФГБУ «Российский онкологический центр им. Н.Н. Блохина» РАМН и МНИОИ им. П.А. Герцена. Опухолевый материал и образцы периферической крови непосредственно после операции замораживали и хранили при температуре от -18 до -70°C . Часть образцов представлена в виде архивного материала (парафинизированные блоки). Гистологическая идентификация тканей проведена в отделе патологической анатомии опухолей человека НИИ клинической онкологии ФГБУ «Российский онкологический центр им. Н.Н. Блохина» РАМН и отделении патоморфологии МНИОИ им. Герцена.

Экстракция геномной ДНК. Геномную ДНК из тканей глиобластомы и лимфоцитов периферической крови выделяли стандартным методом фенолхлороформной экстракции. Выделение геномной ДНК из архивного материала проводили с использованием коммерческого набора «QIAamp DNA FFPE Tissue Kit» («QIAGEN», Германия) по протоколу, рекомендованному производителем.

Микросателлитный анализ. ПЦР областей микросателлитных повторов проводили по следующей схеме: к 0,1 мкг геномной ДНК добавляли 0,05 мкМ каждого праймера (нуклеотидные последовательности и температуры отжига праймеров представлены в табл. 1), 200 мкМ каждого дезоксинуклеотидтрифосфата, 2 мкМ MgCl_2 , 1 е.а. Taq-полимеразы, 2,5 мкл десятикратного буфера для ПЦР следующего состава: 50 мМ KCl, 10 мМ Трис-HCl (pH 8,4), деионизированной воды до 25 мкл. Амплификацию проводили по программе: первичная денатурация 95°C — 5 мин; 33 цикла с параметрами 94°C — 40 с, $T_{\text{отж}}$ — 40 с, 72°C — 40 с; финальная элонгация 72°C — 10 мин. ПЦР-продукты разделяли с помощью вертикального электрофореза в 8% ПААГ и окрашивали нитратом серебра.

Отбор генов-кандидатов в новых хромосомных участках потери гетерозиготности при глиобластоме проводили исходя из расстояния между генами и изученными микросателлитными повторами, с учётом известных

функций генов (участие в сигнальных путях, вовлечённых в онкогенез, регуляция клеточной пролиферации, дифференцировки, экспрессии генов) и анализа публикаций, указывающих на возможную роль генов в развитии злокачественных новообразований. В качестве максимального расстояния между микросателлитным маркером, для которого показана потеря гетерозиготности, до возможного гена-кандидата выбрали 500 т.п.н., исходя из того, что протяжённость участков потери гетерозиготности в опухолевых геномах, как правило, превышает 1 млн п.н. [5, 7, 13].

Результаты и обсуждение

Одним из наиболее доступных и эффективных подходов для изучения аллельного дисбаланса является микросателлитный анализ, подразумевающий сравнение аллелей микросателлитных маркеров в нормальной и опухолевой тканях пациента. Этот метод не требует специального оборудования и является более дешёвым и простым в использовании по сравнению с флуоресцентной гибридизацией *in situ* (FISH) и сравнительной геномной гибридизацией.

Для изучения аллельного дисбаланса при глиобластоме нами были выбраны 11 хромосомных локусов:

2q31.2, 3p25.1, 5q14.3, 6p21.1, 7q21.2, 9q21.33, 12q21.33, 16p13.12, 18q11.2, 19p13.2, 21q21.1, в которых ранее не описано случаев нарушения копийности при глиобластоме. Ни один из выбранных локусов не связан с развитием глиобластомы согласно OMIM. Также для контроля репрезентативности выборки, проанализированы дополнительно 2 хромосомных сегмента: 8q21.3 и 14q13.3, случаи аллельного дисбаланса в которых были описаны в работах других авторов [11]. Анализ аллельного состояния микросателлитных маркеров, расположенных в исследуемых хромосомных участках, был проведен для 108 образцов глиобластомы. Вывод об аллельном состоянии каждого маркера делали на основе разделения аллелей исследуемых микросателлитных повторов в ПААГ (рис. 1).

Результаты исследования представлены на рис. 2. Аллельного дисбаланса не выявлено лишь для 2 из 13 исследованных локусов: 18q11.2 и 21q21.1, во всех остальных геномных участках выявлены случаи аллельного дисбаланса с различными частотами, указанными в табл. 2. В таблице приведены также возможные гены-кандидаты, расположенные в соответствующих областях генома. Аллельный дисбаланс в исследованных локусах может быть как самостоятельным маркером нестабильности генома при глиобластоме, так и указанием

Таблица 1

Праймеры для микросателлитного анализа аллельного дисбаланса

Аmplифицируемая область	Последовательность праймера	T _{отж.} , °C	Размер ПЦР-продукта, п.н.*
2q31.2-18xTG	F: ACGCCAAAAGACAGTGCCAT R: AAGCAGAGAACCCTTGTAAGAGGA	62	142
3p25.1-22xTG	F: CACCAGCCTGCTACCACTA R: TCCCTCAAGTCCTGAATGCC	60	148
5q14.3-17xAC	F: CACCTCCAGAAGCTTCCTCC R: TCTAGATGAGACAGAAGCAGGC	62	123
6p21.1-16xGT	F: CTTGCCAGTCAGTCCACACA R: TGATCCCAGATGATTTTGTTGGT	62	138
7q21.2-15xTG	F: ATCTCTCTGGCGAATCCTGG R: GAAGCCCAATGAACGATGCC	62	124
8q21.3-15xGT	F: ACATGACTTGGATGGGAACCA R: ACATAAGTGCTTTATTCATTGCTCT	60	111
9q21.33-15xGT	F: GGCAGAGAAGAATGATTTGGCA R: TGGTGTTAAGATGCATCCCAA	62	150
12q21.33-AC	F: AGTTGAAATCCGGGTATGGA R: ACAATTGTGTAGGCAGAACT	60	126
14q13.3-21xAC	F: AAGAGCGTTAGATGATGACCC R: GCTTCAGAGAAGATCTAGGCCA	62	138
16p13.12-19xTG	F: AGCTTAAGACAGAATGGCAGG R: CCTCTCTGACCCCTCTGCTA	64	146
18q11.2-17xAC	F: AGTTTGCCTCTTCTGCTCCA R: ACTGCTGTCTAGTAAGCATACCA	62	139
19p13.2-19xGT	F: ACAAAAGCCACAACTCAAAAGG R: CACACCGAGATTAGGGCTGG	64	136
21q21.1-15xTG	F: ACTGTCTGGTTTCCCATCTC R: TGGACATCCTAACAACAATTCCT	60	130

Примечание. * — в соответствии с консенсусной последовательностью генома человека GRCh37/hg19

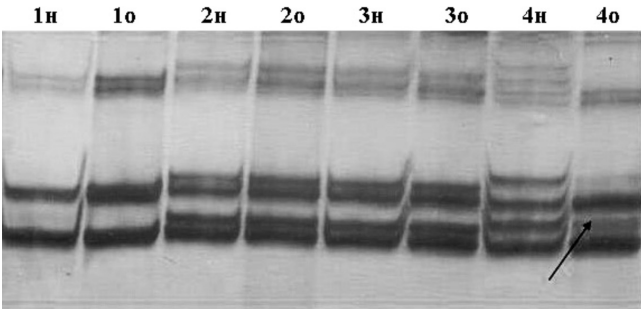


Рис. 1. Пример результатов микросателлитного анализа локуса 9q21.33:
н — ДНК нормальной ткани (из лимфоцитов периферической крови); о — ДНК опухоли; М — маркер молекулярной массы PUC19/MspI. Неинформативное состояние маркера в образце 1, отсутствие дисбаланса в образцах опухоли 2 и 3, аллельный дисбаланс в образце опухоли 4 (стрелкой показан ПЦР-продукт, сниженная концентрация которого свидетельствует о ПГ).

на возможную вовлечённость генов, расположенных в этих регионах или находящихся рядом с этими областями, в процессы канцерогенеза.

Наибольшие частоты дисбаланса выявлены в локусах 3p25.1 (19,0%), 5q14.3 (11,1%), 7q21.2 (28,6%), 16p13.12 (9,6%), 19p13.2 (17,0%). В локусах 8q21.3 и 14q13.3 аллельный дисбаланс определен с частотами 15,8% и 42,3% соответственно, что совпадает с результатами других авторов [11]. Среди генов, расположенных в исследованных локусах или рядом с ними, в соответствии с критериями, указанными в разделе «Материалы и методы», нами были выбраны в качестве генов-кандидатов следующие: *TTN*, *SLC6A6*, *SUPT3H*, *AKAP9*, *MMP16*, *ZCCHC6*, *DCN*, *MKL2*, *PIN1*, *NKX2* (табл. 2). Из 13 исследованных в работе микросателлитов, 4 расположены непосредственно в интронах генов. В этих случаях (*TTN*, *SUPT3H*, *AKAP9* и *MMP16*) результаты про-

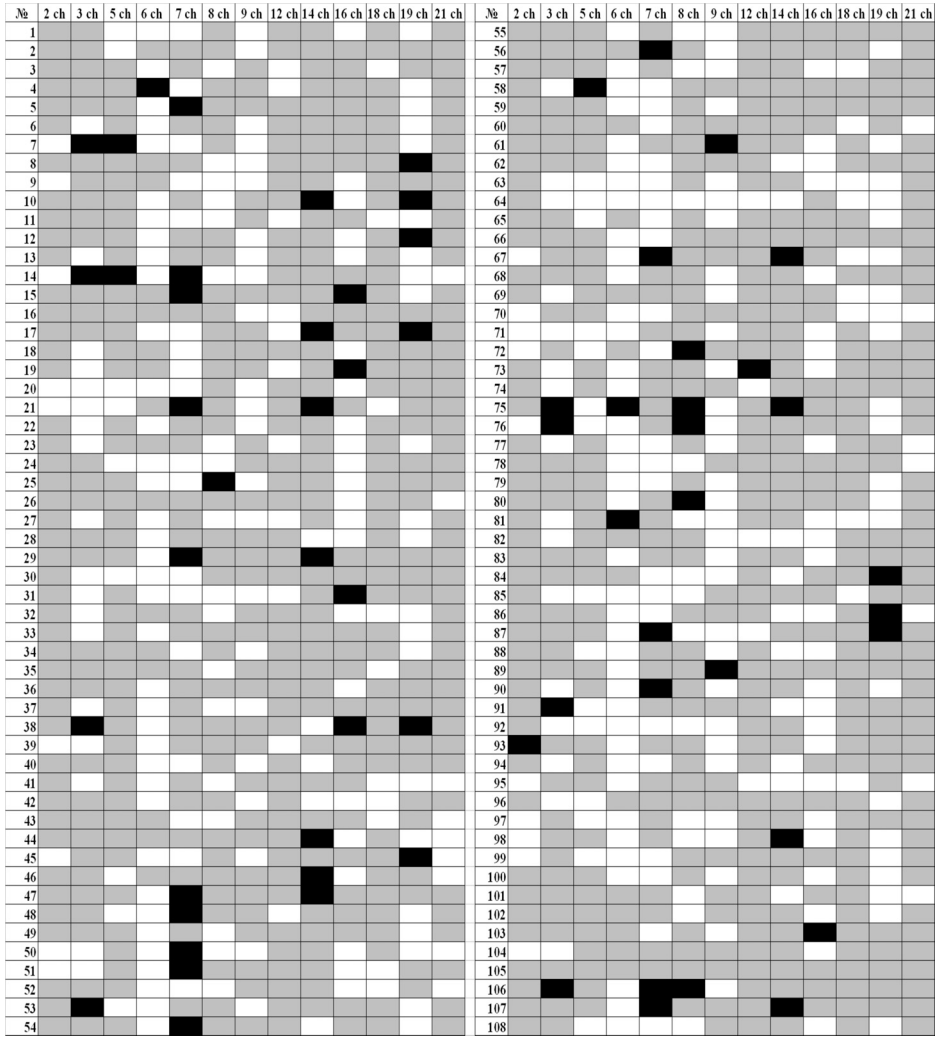


Рис. 2. Состояние микросателлитных маркеров в исследованной выборке глиобластомы. Белым цветом отмечено гетерозиготное состояние маркера в опухоли, серым — неинформативное состояние (гомозиготное в лимфоцитах периферической крови), чёрный цвет обозначает аллельный дисбаланс по конкретному маркеру.

ведённого микросателлитного анализа, несомненно, отражают статус соответствующих генов с точки зрения частот их аллельного дисбаланса в глиобlastомах. Мутации в гене *TTN* обнаружены во многих видах злокачественных опухолей с высокой частотой, в том числе и в глиобlastоме. Предполагается, что этот ген играет специфическую роль в развитии и прогрессии опухоли [16]. Ген *SUPT3H* кодирует транскрипционный фактор, необходимый для экспрессии генов с участием РНК-полимеразы II [28]. Белок, кодируемый геном *AKAP9*, является членом семейства якорных белков А-киназ (семейство AKAP), участвующих в связывании регуляторной единицы протеинкиназы А, которая, в свою очередь, является активатором сигнального пути RAS-RAF-MAPK [11]. Ген *MMP16* кодирует белок семейства матричных металлопротеиназ (MMP), участвующих в разрушении внеклеточного матрикса в физиологических процессах (регенерация и ремоделирование тканей, развитие эмбриона), а так же в патологических (метастазирование). Li Y. с соавторами установили, что инактивация *MMP16* посредством микроРНК приводит к подавлению миграции опухолевых клеток и инвазии в gliомах [19].

Для шести микросателлитов, показавших потерю гетерозиготности в глиобlastомах, нами предложены близлежащие гены-кандидаты, расположенные от полиморфного маркера на расстоянии не более 500 т.п.н. (гены *SLC6A6*, *ZCCHC6*, *DCN*, *MKL2*, *PIN1*, *NKX2-8*). Ген *SLC6A6* кодирует мембранный белок-транспортер. Kim S.J. с соавторами показали, что *SLC6A6* напрямую связан с сигнальным путём супрессора опухолевого роста TP53 [17]. Продукт гена *ZCCHC6* представляет собой уридил-трансферазу — фермент, катализирующий добавление уридинов к 3'-концу РНК, тем самым при-

нимая участие в регуляции генной активности [18]. Ген *DCN* кодирует небольшой протеогликан экстрацеллюлярного матрикса — декорин. Показано, что низкая экспрессия *DCN* в раке молочной железы ассоциирована с быстрой прогрессией опухоли и низкой выживаемостью пациентов [24]. Белок *MKL2*, кодируемый одноименным геном, принадлежит к семейству миокардин-связанных транскрипционных факторов (MRTF) и является медиатором TGF- β 1-индуцированного эпителиально-мезенхимального перехода — сложного процесса, происходящего в эмбриональном развитии, а также при опухолевой прогрессии. Дополнительно белки — члены семейства MRTF принимают участие в активации транскрипции генов актинового цитоскелета [21]. Ген *PIN1* кодирует изомеразу, субстратами которой является большое число важных регуляторов клеточного цикла, как онкогенных, так и супрессоров, таких, как: циклин D1, p53, Cdc25, c-Myc, c-Jun, β -катенин, Bcl-2. Таким образом, взаимодействуя с этими субстратами, продукт гена *PIN1* индуцирует конформационные изменения, которые могут приводить к активации сигнальных путей, характерных для опухолей [25].

Потери гетерозиготности в хромосомном сегменте 14q13.3 часто выявляются не только при глиобlastомах, но и при других злокачественных опухолях [11, 13]. Эксперименты, проведенные Haggis T. с соавторами, показали, что из генов, входящих в область наименьшего перекрытия областей потери гетерозиготности в этом районе (*MBIP*, *SFTA*, *TTF1*, *NKX2-8*, *PAX9*) наиболее вероятным геном-кандидатом является гомеобоксный ген *NKX2-8*, активация экспрессии которого ингибирует рост некоторых линий раковых клеток [13].

Таблица 2

Частоты аллельного дисбаланса в исследуемых хромосомных локусах при глиобlastоме и предполагаемые гены-кандидаты, расположенные в этих участках

Микросателлитный маркер	Частота аллельного дисбаланса в информативных образцах	Возможные гены-кандидаты	Расстояние до микросателлитного маркера
2q31.2-18xTG	5,0% (1/20)	<i>TTN</i>	Внутригенный повтор
3p25.1-22xTG	19,0% (8/42)	<i>SLC6A6</i>	125 т.п.н.
5q14.3-17xAC	11,1% (3/27)	—	—
6p21.1-16xGT	3,8% (3/79)	<i>SUPT3H</i>	Внутригенный повтор
7q21.2-15xTG	28,6% (16/56)	<i>AKAP9</i>	Внутригенный повтор
8q21.3-15xGT	15,8% (6/38)	<i>MMP16</i>	Внутригенный повтор
9q21.33-15xGT	3,6% (2/56)	<i>ZCCHC6</i>	335 т.п.н.
12q21.33-AC	5,9% (1/17)	<i>DCN</i>	500 т.п.н.
14q13.3-21xAC	42,3% (11/26)	<i>NKX2-8</i>	310 т.п.н.
16p13.12-19xTG	9,6% (5/52)	<i>MKL2</i>	50 т.п.н.
18q11.2-17xAC	0% (0/20)	—	—
19p13.2-19xGT	17,0% (9/53)	<i>PIN1</i>	2 т.п.н.
21q21.1-15xTG	0% (0/15)	—	—

Для хромосомного сегмента 5q14.13 генов-кандидатов не удалось обнаружить на расстоянии до 5 млн.п.н. от изученного в работе микросателлитного маркера.

Таким образом, в настоящем исследовании обнаружено 9 новых локусов аллельного дисбаланса при глиобластоме: 2q31.2, 3p25.1, 5q14.3, 6p21.1, 7q21.2, 9q21.33, 12q21.33, 16p13.12, 19p13.2, в которых прежде не было описано явлений аллельного дисбаланса другими авторами. Также нами выявлен аллельный дисбаланс в локусах 8q21.3 и 14q13.3 с частотами, соответствующими результатам других исследователей. Полученные результаты свидетельствуют об актуальности продолжения изучения глиобластомы на молекулярно-генетическом уровне для лучшего понимания изменений, лежащих в основе развития этого злокачественного новообразования, что позволит идентифицировать мишени для разработки новых терапевтических средств, а также выявить потенциальные маркеры прогноза течения заболевания и ответа на терапию. Выявленные нами новые участки аллельного дисбаланса представляют собой потенциальные молекулярно-генетические маркеры прогноза течения заболевания и ответа на терапию, а также могут содержать гены-кандидаты, играющие роль в этиопатогенезе глиобластомы.

Список литературы

1. Алексеева Е.А., Шубина М.В., Горбачева Ю.В. и др. Молекулярно-генетическая диагностика в таргетной терапии опухолей головного мозга // Медицинская генетика. — 2012. — №2. — С. 3—10.
2. Алексеева Е.А., Горбачева Ю.В., Бабенко О.В. и др. Молекулярно-генетическая дифференциальная диагностика опухолей головного мозга // Медицинская генетика. — 2012. — №1. — С. 10—14.
3. Кузнецова Е.Б., Пудова Е.А., Танас А.С., Залетаев Д.В., Стрельников В.В. SEMA6B — кандидат на роль гена супрессора опухолевого роста в критическом хромосомном районе 19p13.3 // Медицинская генетика. — 2013. — Т. 12, №2. — С. 32—36.
4. Стрельников В.В., Малышева А.С., Землякова В.В., Кузнецова Е.Б., Алексеева Е.А., Смолин А.В., Прозоренко Е.В., Залетаев Д.В.. Делеции области расположения гена MGMT на хромосоме 10q26.3 в глиомах // Молекулярная медицина. — 2011. — №2. — С. 28—31.
5. Abkevich V., Timms K.M., Hennessy B.T. et al. Patterns of genomic loss of heterozygosity predict homologous recombination repair defects in epithelial ovarian cancer // British journal of cancer. — 2012. — Vol. 107(10). — P. 1776—1782.
6. Adamson C., Kanu O.O., Mehta A.I. et al. Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going // Informa healthcare. — 2009. — Vol. 18(8). — P. 1061—1083.
7. Cairncross J.G., Ueki K., Zlatescu M.C. et al. Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas // J. Natl. Inst. — 1998. — Vol. 90. — P. 1473—1479.
8. Cifola I., Spinelli R., Beltrame L. et al. Genome-wide screening of copy number alterations and LOH events in renal cell carcinomas and integration with gene expression profile // Molecular cancer. — 2008. — Vol. 7(1). — P. 6.
9. Davis F.G., McCarthy B.J. Current epidemiological trends and surveillance in brain tumors // Anticancer Ther. — 2001. — Vol. 1, №3. — P. 395—401.
10. Frank B., Wiestler M., Kropp S. et al. Association of a Common AKAP9 Variant With Breast Cancer Risk: A Collaborative Analysis // J. Natl. Cancer. — 2008. — Vol. 100. — P. 437—442.
11. Furnari F.B., Fenton T., Bachoo R.M. et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment // Genes. Dev. — 2007. — Vol. 21. — P. 2683—2710.
12. Ginzinger D.G., Godfrey T.E., Nigro J. et al. Measurement of DNA copy number at microsatellite loci using quantitative PCR analysis // Cancer research. — 2000. — Vol. 60(19). — P. 5405—5409.
13. Harris T., Pan Q., Sironi J. et al. Both gene amplification and allelic loss occur at 14q13.3 in lung cancer // Clinical Cancer Research. — 2011. — Vol. 17(4). — P. 690—699.
14. Heaphy C.M., Bissofi M., Griffith J.K. Diagnostic significance of allelic imbalance in cancer // Informa healthcare. — 2007. — Vol. 1(2). — P. 159—168.
15. Heroux M.S., Chesnik M.A., Halligan B.D. et al. Comprehensive characterization of glioblastoma tumor tissue for biomarker identification using mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics // Physiol. Genomics. — 2014. — Vol. 46. — P. 467—481.
16. Kim N., Hong Y., Kwon D. et al. Somatic Mutaome Profile in Human Cancer Tissues // Genomics and Informatics. — 2013. — Vol. 11(4). — P. 239—244.
17. Kim S.J., Sohn I., Do I.-G. et al. Gene expression profiles for the prediction of progression-free survival in diffuse large B cell lymphoma: results of a DASL assay // Ann. Hematol. — 2014. — Vol. 93. — P. 437—447.
18. Lapointe C.P., Wickens M. The Nucleic Acid-binding Domain and Translational Repression Activity of a Xenopus Terminal Uridyl Transferase // J. Biol. Chem. — 2013. — Vol. 288(28). — P. 20723—20733.
19. Li Y., Wang Y., Yu L. miR-146b-5p inhibits glioma migration and invasion by targeting MMP16 // Cancer Letters. — 2013. — Vol. 339(2). — P. 260—269.
20. Mizoguchi M., Kuga D., Guan Y. Loss of heterozygosity analysis in malignant gliomas // Brain Tumor Pathol. — 2011. — Vol. 28. — P. 191—196.
21. Morita T., Mayanagi T., Sobue K. Dual roles of myocardium-related transcription factors in epithelial-mesenchymal transition via slug induction and actin remodeling // The J. of Cell Biology. — 2007. — Vol. 179. — P. 1027—1042.
22. Nigro J.M., Takahashi M.A., Ginzinger D.G. et al. Detection of 1p and 19q loss in oligodendroglioma by quantitative microsatellite analysis, a real-time quantitative polymerase chain reaction assay // The American journal of pathology. — 2001. — Vol. 158(4). — P. 1253—1262.
23. Ruano Y., Mollejo M., Ribalta T. et al. Identification of novel candidate target genes in amplicons of Glioblastoma multiforme tumors detected by expression and CGH microarray profiling // Molecular Cancer. — 2006. — Vol. 5. — P. 39.
24. Sainio A., Nyman M., Lund R. et al. Lack of Decorin Expression by Human Bladder Cancer Cells Offers New Tools in the Therapy of Urothelial Malignancies // Plos One. — 2013. — Vol. 8. — P. 1—8.
25. Tao L.-J., Chen Y.-S., Yao L. et al. PIN1 promoter polymorphism (842G>C) contributes to a decreased risk of cancer: Evidence from meta-analysis // Oncology Letters. — 2014. — Vol. 8. — P. 1360—1366.
26. Van Meir E.G., Hadjipanayis C.G., Norden A.D. et al. Exciting New Advances in Neuro-Oncology: the Avenue to a Cure for Malignant Glioma // CA Cancer J. Clin. — 2010. — Vol. 60(3). — P. 166—193.
27. Yu J., Madison J.M., Mundlos S. Characterization of a Human Homologue of the Saccharomyces cerevisiae Transcription Factor Spt3 (SUPT3H) // Genomics. — 1998. — Vol. 53. — P. 90—96.

Analysis of allelic imbalance in glioblastoma: new chromosomal regions of loss of heterozygosity and new candidate genes

Alekseeva E.A.^{1,2}, Tanas A.S.^{1,2,3}, Zaytsev A.M.⁴, Kirsanova O.N.⁴,
Samarin A.E.⁴, Prozorenko E.V.⁵, Zaletaev D.V.^{1,2,3}, Strelnikov V.V.^{1,2,3}

¹ — Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russian Federation, 115478, Moskvorechye St, 1, e-mail: vstrel@list.ru

² — I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation, 119991, Trubetskaya St, 8, e-mail: tanas80@gmail.com

³ — Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation, 117997, Ostrovityanova St, 1, e-mail: zalnem@mail.ru

⁴ — P.A. Hertsen Research Centre for Oncology, Moscow, Russian Federation, 125284, 2nd Botkinsky Avenue, 3, e-mail: azaitsev_nsi@mail.ru

⁵ — N.N. Blockin Russian Research Center for Oncology, Moscow, Russian Federation, 115478, Kashirskoe highway, 24, e-mail: prozorenko1984@mail.ru

By means of microsatellite analysis we have evaluated allelic status of eleven chromosome loci for which allelic imbalance (AI) had never been described in glioblastoma. Two of the eleven loci, 18q11.2 and 21q21.1, revealed no allelic imbalance in 108 glioblastoma samples. However, AI was identified at 2q31.2, 3p25.1, 5q14.3, 6p21.1, 7q21.2, 9q21.33, 12q21.33, 16p13.12, 19p13.2 with the frequencies of 5.0%, 19.0%, 11.1%, 3.8%, 28.6%, 3.6%, 5.9%, 9.6%, 17.0%, respectively, demonstrating the necessity to expand molecular genetic studies of glioblastoma. To test if our sampling is representative we have analyzed 8q21.3 and 14q13.3 loci where AI had been previously described. AI at these loci was confirmed with the frequencies of 15.8% and 42.3%, respectively, which is consistent with the previously published data. We discuss potential candidate genes located in the chromosomal loci for which LOH has been identified in this study.

Key words: glioblastoma, allelic imbalance, LOH, candidate genes