

SEMA6B — кандидат на роль гена супрессора опухолевого роста в критическом хромосомном районе 19p13.3

Кузнецова Е.Б.^{1,2}, Пудова Е.А.³, Танас А.С.^{1,2}, Залетаев Д.В.^{1,2}, Стрельников В.В.^{1,2}

¹ — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Медико-генетический научный центр»

Российской академии медицинских наук, Москва, 115478, ул. Москворечье, д. 1, факс: (495) 324-07-02, e-mail: vstrel@list.ru

² — Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования

Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения

Российской Федерации, Москва, 119992, ул. Трубецкая, д. 8, факс: (495) 622-96-35, e-mail: vstrel@list.ru

³ — Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии»

Роспотребнадзора, Москва, 111123, ул. Новогиреевская, д. 3-а, тел: (495) 672-11-58 факс: (495) 304-22-09, e-mail: el_pudov@mail.ru

Результаты многочисленных исследований свидетельствуют о крайне высокой частоте потери гетерозиготности на коротком плече хромосомы 19 — в хромосомном сегменте 19p13.3 — при различных видах злокачественных новообразований: при раке ободочной кишки, шейки матки, молочной железы, при миелоидном лейкозе. Данные о высокой частоте потери гетерозиготности 19p13.3 заставляют предположить наличие в этом сегменте одного или нескольких генов-супрессоров опухолевого роста. Ранее нами было выявлено аномальное метилирование 5'-области гена *SEMA6B*, расположенного в критическом районе, в образцах рака молочной железы (РМЖ). Проведённый в настоящем исследовании анализ молекулярной патологии *SEMA6B* выявил и другие особенности, характерные для гена супрессора опухолевого роста: частота потери гетерозиготности *SEMA6B* при РМЖ составила 50%; у одной из пациенток с РМЖ выявлена мутация в эволюционно консервативном участке гена.

Ключевые слова: рак молочной железы, супрессоры опухолевого роста, хромосомный район 19p13.3, семафорин, *SEMA6B*, метилирование ДНК, потеря гетерозиготности, мутации

Введение

Изучение аллельного дисбаланса хромосомных участков позволило обнаружить в геномах злокачественных новообразований локусы с изменениями копийности, характерными для определённых типов опухолей. Целе-направленное исследование этих локусов привело к выявлению целого ряда генов, вовлечённых в канцерогенез: *AKT2*, *ERBB2*, *MYC*, *MYCL1*, *MYCN*, *REL* и др. [8, 15]. По некоторым оценкам, поиск генов, вовлечённых в канцерогенез, в областях аллельного дисбаланса более эффективен, чем отбор для анализа генов с определёнными функциями [16]. Тем не менее, существуют хромосомные сегменты, в которых, несмотря на высокую частоту наблюдаемого в опухолях аллельного дисбаланса, до сих пор не выявлены ключевые гены, вовлечённые в канцерогенез. В их числе — дистальный сегмент короткого плеча 19-й хромосомы, 19p13.3. Это C,G-богатый участок ДНК, содержащий значительное количество генов [12]. Потеря гетерозиготности по 19p13.3 была показана при различных видах злокачественных новообразований, в частности при РМЖ, при раке ободочной кишки, шейки матки, при миелоидном лейкозе [10, 18, 19], причём для частот аллельных делеций этого локуса при РМЖ были неоднократно показаны весьма высокие значения: от 21 до 47% [6, 11, 20]. Что примечательно, хромосомный сегмент 19p13.3 содержит ген *LKB1*, мутации в котором приводят к развитию синдрома Пейтца—Егерса [14]. Это редкое заболе-

вание наследуется по аутосомно-доминантному типу и характеризуется пигментными пятнами на коже и слизистых, полипами желудочно-кишечного тракта и повышенным риском развития новообразований, в частности РМЖ. Однако в работах, посвящённых исследованию этого гена при спорадических опухолях молочной железы и при синдроме Пейтца—Егерса, потери гетерозиготности в гене *LKB1* были выявлены только у больных с синдромом Пейтца—Егерса [5]. У пациентов со спорадическими формами рака делеций этого гена обнаружено не было, хотя отмечались делеции в локусе 19p13.3 по другим маркерам. Можно предполагать, что повреждения гена *LKB1* приводят к развитию наследственного синдрома Пейтца—Егерса, однако в патогенезе спорадических форм РМЖ играют незначительную роль. Между тем, высокие частоты потерь гетерозиготности по ряду микросателлитных маркеров в локусе 19p13.3 и недавно продемонстрированная ассоциация частоты этих потерь со степенью злокачественности опухолей молочной железы заставляют предположить наличие в этой области одного или нескольких генов-супрессоров опухолевого роста помимо уже известного *LKB1* [20]. Проведённые нами исследования позволяют предложить на роль такого кандидата ген *SEMA6B*.

Аномальное метилирование 5'-области гена *SEMA6B* было выявлено нами ранее в образцах РМЖ при скрининге дифференциального метилирования геномов методом метилчувствительного фенгипринтинга [1, 2,

17]. В настоящей работе суммированы результаты изучения аномального метилирования, потери гетерозиготности и скрининга мутаций в гене *SEMA6B* при РМЖ.

Материалы и методы

Исследование проведено на материале тканей опухолей и венозной крови, полученных от 100 больных РМЖ. Геномную ДНК выделяли стандартным методом фенол-хлороформной экстракции. Выделение РНК проводили методом кислофенольной экстракции с использованием набора «РИБО-золь-А» (ИнтерЛабсервис, Москва). Для синтеза кДНК образцы РНК обрабатывали ДНКазой (Fermentas, Литва) и проводили обратную транскрипцию с использованием набора Реверта-Л (ИнтерЛабсервис, Москва) по протоколу фирмы-производителя.

Скрининг мутаций в кодирующей части гена *SEMA6B* проводили путём прямого секвенирования перекрывающихся фрагментов кДНК, предварительно амплифицированных методом ПЦР. Температурная схема ПЦР включала в себя предварительную денатурацию при 95°C в течение 5 мин; 33 цикла денатурации/отжига/синтеза при 95°C — 40 с, $T_{отж}$ (таблица) — 40 с, 72°C — 40 с соответственно; финальную элонгацию при 72°C — 10 мин. В состав реакционной смеси входили следующие реагенты: 2,5 мкл 10х буфера для ПЦР (50 мМ KCl, 10 мМ трис-HCl, pH 8.4), по 200 мкМ каждого dNTP, по 10 пкМ праймеров, 1 е.а. Taq-полимеразы, $MgCl_2$ в количестве, определённом экспериментальным путём для каждой пары праймеров (таблица). В реакционную смесь добавляли 0,1–0,2 мкг кДНК; объём смеси доводили деионизованной водой до 25 мкл. Для подтверждения герминаль-

ного характера мутации p.H221R, выявленной в опухоли одной из пациенток, проведено секвенирование геномной ДНК из лимфоцитов периферической крови с использованием праймеров *SEMA6B*-ex8F: ctg gtg ggg aga ttt gat gaa и *SEMA6B*-ex8R: cct ctg cgg tct cat ctc ttg (длина продукта ПЦР — 242 п.н.).

ПЦР варибельной области микросателлитного СА-повтора, прилежащего к гену *SEMA6B*, проводили с праймерами *SEMA6B*-CA1 F: cag agg gtg ttg agg gag tta и *SEMA6B*-CA1 R: gga ggg agg gat ggt gac aac, — по приведённой выше схеме при $T_{отж} = 66^\circ\text{C}$ и конечной концентрации $MgCl_2$ в реакционной смеси, равной 4 мМ.

Результаты

Для генов супрессоров опухолевого роста характерна их инактивация в опухолевых клетках посредством делеций, мутаций и/или аномального метилирования ДНК. Одним из способов определения аллельного состояния геномных локусов, используемых для выявления соматических делеций, является сравнительный анализ аллелей микросателлитных маркёров в нормальной и опухолевой тканях пациента. Нами проведено исследование аллельного состояния области расположения гена *SEMA6B*. В качестве маркёра выбран ближайший к гену полиморфный микросателлитный повтор, расположенный на расстоянии около 15 т.п.н. дистальнее *SEMA6B* (рис. 1).

Этот микросателлитный маркёр представляет собой непрерывный динуклеотидный СА-повтор с консенсусной последовательностью (CA)₂₀. Характеристики повтора ранее не исследовались, однако высокая протяжённость и отсутствие нуклеотидных замен позволи-

Таблица

Праймеры для секвенирования участков кДНК *SEMA6B*

Исследуемый фрагмент	Последовательность (5'→3')	$T_{отж}$, °C	$MgCl_2$, мМ	Размер продукта, н.п.
<i>SEMA6B</i> — ex1-2	F: tca gac agg aaa atg ggc tcg R: ccc cag tag cag cag cag aag	62	4	199
<i>SEMA6B</i> — ex2-3	F: gtc acc tcc tcc tgt cgc ctg R: tcg ctg gat gtt gag gtc gtc	66	2	237
<i>SEMA6B</i> — ex3-5	F: cta tcc cgt gtt tgt ggg cag R: tcc tgt ttg ccc ttc atc cga	62	3	237
<i>SEMA6B</i> — ex5-7	F: atc taa ccc cag cga cat aaa R: cgt cag aga aga ggg caa cat	62	4	245
<i>SEMA6B</i> — ex7-9	F: tcg gag aca aca tca gcg gta R: taa act cca tcg caa tct ccc	58	3	267
<i>SEMA6B</i> — ex9-10	F: cct tac ttt gtc cat gcg gtg R: ggg tac aga gca gtt gag ccg	60	4	201
<i>SEMA6B</i> — ex10	F: cag ttt ggg tgg tga gtg gcат R: ccc aaa ggc aga gga tga gga	67	2	507
<i>SEMA6B</i> — ex11	F: gca cgc act tgt ccg aga tgg R: cct cat ccg ggc act tga ctc	66	3	218
<i>SEMA6B</i> — ex12	F: cct tta cgt tcg tcc tga cca R: tcc tct cac cct cca tct acc	64	4	223

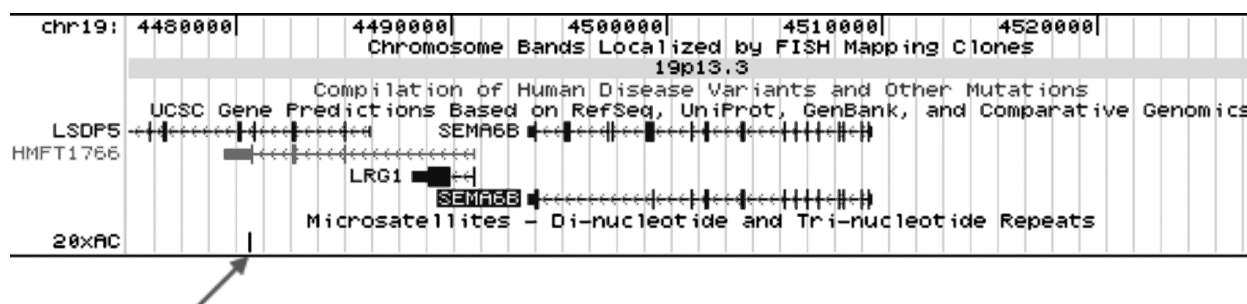


Рис. 1. Расположение микросателлитного СА-повтора (указан стрелкой), использованного для изучения аллельного состояния области расположения гена *SEMA6B*

ли нам предполагать высокий уровень его информативности как маркера. Вывод о наличии или отсутствии аллельного дисбаланса делался на основе разделения исследуемых аллелей в полиакриламидном геле (рис. 2).

Доля образцов ДНК из лимфоцитов периферической крови пациенток с РМЖ, показавших гетерозиготное (информативное) состояние исследуемого СА-повтора, составила 35% (35/100). Частота аллельного дисбаланса в соответствующих образцах опухолей по результатам микросателлитного анализа составила 50% (17/35). Полученное значение достаточно высоко и позволяет расценивать аллельный дисбаланс в области гена *SEMA6B* как маркер опухолевого процесса в молочной железе. Ранее для хромосомного сегмента 19p13.3 уже был показан высокий уровень аллельных делеций, составивший от 21 до 47% в зависимости от расположения исследуемого локуса [20], однако прицельного исследования характера аллельной копияности области гена *SEMA6B* прежде не проводилось.

Возможными событиями, приводящими к инактивации супрессоров опухолевого роста при спорадических формах рака, являются соматические мутации. В поисках такого рода мутаций нами проведено секвенирова-

ние экзонов гена *SEMA6B* в материале кДНК, полученном из 30 образцов РМЖ.

В одном из опухолевых образцов выявлена миссенс-мутация в экзоне 8 *SEMA6B* (рис. 3). Замена в 867-м нуклеотиде кДНК приводит к изменению аминокислотной последовательности белка: к замене гистидина на аргинин (p.H221R). В образце кДНК указанная мутация выявлена в гомозиготном состоянии. Исследование ДНК из лимфоцитов периферической крови той же пациентки показало герминальный характер мутации (мутация в гетерозиготном состоянии). Наличие мутации подтверждено рестрикционным анализом с использованием эндонуклеазы рестрикции *FatI* с сайтом узнавания CATG. При секвенировании кДНК других образцов РМЖ данная мутация не обнаружена. Информация о соответствующей нуклеотидной замене в базе данных полиморфизмов генома человека dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) отсутствует. Каталог соматических мутаций в злокачественных опухолях (COSMIC, <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) по состоянию на февраль 2013 г. содержит информацию о секвенировании гена *SEMA6B* в 304 образцах РМЖ, выявившем единственную мутацию, p.L191R.

Обсуждение

Ген *SEMA6B* кодирует семафорин 6В, относящийся к семейству семафоринов — белков, характеризующихся наличием консервативного SEMA-домена. Семейство насчитывает 7 классов белков, включающих как секреторные, так и трансмембранные формы, которые, по-видимому, задействованы в развитии центральной и периферической нервной системы. Первоначально считалось (по аналогии с первыми изученными представителями семейства), что функции семафоринов в нервной системе сводятся к регуляции направленного роста аксонов, однако далеко не для всех представителей семафоринов удалось доказать столь узкую специализацию [13]; функции же многих, в том числе SEMA6B, до сих пор не охарактеризованы. Возможно, это связано с недооценкой роли в развитии нервной системы глиальных клеток, которые составляют до 90% клеток нервной системы человека и экспрессируют те же типы семафоринов, что и нейроны. В процессе развития клетки глиии прохо-

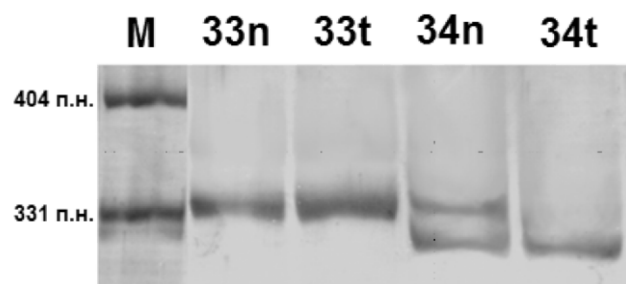


Рис. 2. Результаты микросателлитного анализа аллельных потерь гена *SEMA6B*:

М — маркер молекулярного веса; 33, 34 — номера парных образцов РМЖ (t-опухоль, n-норма). Образец 33 гомозиготен (неинформативен) по анализируемому микросателлитному маркеру. В четвертой дорожке (34n) четко видны два аллеля, в пятой дорожке с образцом опухолевой ткани той же пациентки (34t) отсутствует более тяжелый аллель, следовательно, для данной пары образцов можно сделать заключение об аллельном дисбалансе.

дят стадии дифференцировки из мультипотентных предшественников, мигрируют на значительные расстояния и создают условия для направленной миграции и выживания нейронов. Кроме того, недавние исследования показывают, что молекулы направленного роста аксонов («axon guidance molecules») повсеместно экспрессируются в тканях человеческого организма, при этом их функции за пределами нервной системы по большей части не изучены. Тем не менее, в последнее время накапливаются свидетельства их вовлечения во многие патологические процессы, особенно в процессы канцерогенеза [9].

Важнейшим механизмом инактивации генов супрессоров опухолевого роста в клетках злокачественных новообразований является метилирование их регуляторных областей. Ранее нами было выявлено аномальное метилирование 5'-области гена *SEMA6B* в образцах РМЖ [1] и определена частота этого события, составившая 38% [2]. В свете показанного нами дифференциального метилирования *SEMA6B* при РМЖ необходимо упомянуть, что гиперметилирование промотора другого представителя семейства семафоринов, *SEMA3B*, было описано при немелкоклеточном раке лёгкого [9], причём эксперименты по реактивации *SEMA3B* в клетках РМЖ показали, что он обладает свойствами гена-супрессора опухолевого роста с проапоптотическим действием. Участие в апоптозе, клеточной пролиферации и миграции, а также в определении метастатического потенциала опухоли уже показано для целого ряда представителей семейства семафоринов [3, 4, 7].

В настоящей работе продолжен анализ возможных путей инактивации гена *SEMA6B* при РМЖ, исследованы состояние зиготности и сохранность нуклеотидной последовательности гена в образцах РМЖ. Полученные данные о высокой частоте аллельного дисбаланса гена *SEMA6B* при РМЖ подкрепляют высказанное нами предположение о его возможной роли в онкогенезе. Полученные результаты, в сочетании с данными литературы, свидетельствуют о том, что *SEMA6B* — один из возможных генов-кандидатов на роль супрессора опухолевого роста в хромосомном сегменте 19p13.3.

Список литературы

1. Кузнецова Е.Б., Дрозд О.В., Бабенко О.В., Землякова В.В., Немцова М.В., Залетаев Д.В., Стрельников В.В. Идентификация генов, вовлеченных в канцерогенез, методом метилчувствительного ПЦР-фингерпринтинга // Медицинская генетика. — 2004. — Т. 3, №12. — С. 563—568.
2. Кузнецова Е.Б., Кекеева Т.В., Ларин С.С., Землякова В.В., Бабенко О.В., Немцова М.В., Залетаев Д.В., Стрельников В.В. Новые маркёры метилирования и экспрессии генов при раке молочной железы // Молекулярная биология. — 2007. — Т. 41, №4. — С. 624—633.
3. Basile J.R., Holmbeck K., Bugge T.H., Gutkind J.S. MT1-MMP Controls Tumor-induced Angiogenesis through the Re-

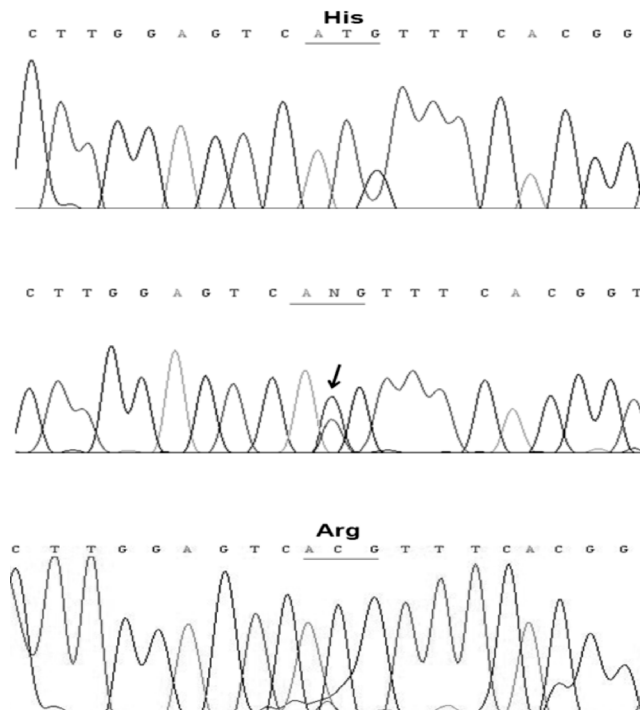


Рис. 3. Результаты секвенирования фрагмента восьмого экзона гена *SEMA6B*.

Вверху — пример нормальной последовательности.

В центре — сиквенс образца ДНК из лимфоцитов пациентки РМЖ с мутацией p.H221R, стрелкой отмечена позиция мутации, обнаруженной в гетерозиготном состоянии.

Внизу — сиквенс образца ДНК из опухоли молочной железы той же пациентки, мутация p.H221R в гомозиготном состоянии.

Высокая степень консервативности, характерная для аминокислотного остатка гистидина в позиции 221 белка *SEMA6B* среди позвоночных (млекопитающих, птиц, рептилий, амфибий, рыб) позволяет предполагать, что обнаруженная нами мутация p.H221R может влиять на функциональную активность белка *SEMA6B*.

lease of Semaphorin 4D // J. Biol. Chem. — 2007. — Vol. 282. — P. 6899—6905.

4. Christensen C., Ambartsumian N., Gilestro G. et al. Proteolytic Processing Converts the Repelling Signal Sema3E into an Inducer of Invasive Growth and Lung Metastasis // Cancer Res. — 2005. — Vol. 65. — P. 6167—6177.

5. Connolly D.C., Katabuchi H., Cliby W.A. Cho K.R. Somatic Mutations in the STK11/LKB1 Gene Are Uncommon in Rare Gynecological Tumor Types Associated with Peutz-Jegher's Syndrome // Am. J. Pathol. — 2000. — Vol. 156. — P. 339.

6. Forster L.F., Defres S., Goudie D.R., Baty D.U., Carey F.A. An investigation of the Peutz-Jeghers gene (LKB1) in sporadic breast and colon cancers // J. Clin. Pathol. — 2000. — Vol. 53. — P. 791—793.

7. Futamura M., Kamino H., Miyamoto Y. et al. Possible Role of Semaphorin 3F, a Candidate Tumor Suppressor Gene at 3p21.3, in p53-Regulated Tumor Angiogenesis Suppression // Cancer Res. — 2007. — Vol. 67. — P. 1451—1460.

8. Futreal P.A., Coin L., Marshall M. et al. A census of human cancer genes // Nat. Rev. Cancer. — 2004. — Vol. 4(3). — P. 177—183.

9. Kuroki T., Trapasso F., Yendamuri S. et al. Allelic Loss on Chromosome 3p21.3 and Promoter Hypermethylation of Semaphorin 3B in Non-Small Cell Lung Cancer // *Cancer Res.* — 2003. — Vol. 63. — P. 3352–3355.
10. Lee J.Y., Dong S.M., Kim H.S. et al. Distinct Region of Chromosome 19p13.3 Associated with the Sporadic Form of Adenoma Malignum of the Uterine Cervix // *Cancer Res.* — 1998. — Vol. 58. — P. 1140–1143.
11. Oesterreich S., Allred D.C., Mohsin S.K. et al. High rates of loss of heterozygosity on chromosome 19p13 in human breast cancer // *Br. J. Cancer.* — 2001. — Vol. 84(4). — P. 493–498.
12. Puttagunta R., Gordon L.A., Meyer G.E. et al. Comparative Maps of Human 19p13.3 and Mouse Chromosome 10 Allow Identification of Sequences at Evolutionary Breakpoints // *Genome Res.* — 2000. — Vol. 10. — P. 1369–1380.
13. Qu X., Wei H., Zhai Y. et al. Identification, Characterization, and Functional Study of the Two Novel Human Members of the Semaphorin Gene Family // *J. Biol. Chem.* — 2002. — Vol. 277. — P. 35574–35585.
14. Resta N., Simone C., Marenzi C., Montera M., Gentile M., et al. STK11 Mutations in Peutz-Jeghers Syndrome and Sporadic Colon Cancer // *Cancer Res.* — 1998. — Vol. 58. — P. 4799–4801.
15. Santarius T., Shipley J., Brewer D., Stratton M.R., Cooper C.S. A census of amplified and overexpressed human cancer genes // *Nat. Rev. Cancer.* — 2010. — Vol. 10(1). — P. 59–64.
16. Stratton M.R. Exploring the Genomes of Cancer Cells: Progress and Promise // *Science.* — 2011. — Vol. 331. — P. 1553–1558.
17. Tanas A.S., Shkarupov V.V., Kuznetsova E.B., Zaletayev D.V., Strelnikov V.V. Novel tools for unbiased DNA differential methylation screening // *Epigenomics.* — 2010. — Vol. 2, №2. — P. 325–333.
18. Taniwaki B.M., Nishida K., Takashima T., Nakagawa H. et al. Nonrandom Chromosomal Rearrangements of 14q32.3 and 19p13.3 and Preferential Deletion of 1p in 21 Patients With Multiple Myeloma and Plasma Cell Leukemia // *Blood.* — 1994. — Vol. 84, №7. — P. 2283–2290.
19. Wang Z.-J., Churchman M., Campbell I.G. et al. Allele loss and mutation screen at the Peutz-Jeghers (LKB1) locus (19p13.3) in sporadic ovarian tumours // *Br. J. Cancer.* — 1999. — Vol. 80(1/2). — P. 70–72.
20. Yang T.L., Su Y.R., Huang C.S., Yu J.C., Lo Y.L., Wu P.E., Shen C.Y. High-resolution 19p13.2–13.3 allelotyping of breast carcinomas demonstrates frequent loss of heterozygosity // *Genes Chromosomes Cancer.* — 2004. — Vol. 41(3). — P. 250–256.

***SEMA6B* is a candidate tumor suppressor gene in the critical chromosome region 19p13.3**

Kuznetsova E.B.^{1,2}, Pudova E.A.³, Tanas A.S.^{1,2}, Zaletayev D.V.^{1,2}, Strelnikov V.V.^{1,2}

¹ — Research Centre for Medical Genetics,

1, Moskvorechie St., Moscow, 115478, fax: (495) 324-07-02, e-mail: vstrel@list.ru

² — I.M. Sechenov 1st MSMU, Russian Health Ministry,

8, Trubetskaya St., Moscow, 119991, fax: (495) 622-96-35, e-mail: vstrel@list.ru

³ — Central Research Institute of Epidemiology, Russian Inspectorate for Protection of Consumer Rights and Human Welfare

3a, Novogireevskaya St., Moscow, 111123, Tel: +7495 672 11 58 fax: +7495 304 2209

Numerous studies indicate an extremely high rate of loss of heterozygosity on the short arm of chromosome 19, in the chromosomal segment 19p13.3, for different types of neoplasia: colon, cervical, breast cancers, myeloid leukemia. High rates of 19p13.3 loss of heterozygosity suggest that it contains one or more tumor suppressor genes. Our study of molecular pathology of the *SEMA6B* gene located in a critical area in breast cancer samples reveals features characteristic of the tumor suppressor gene. The frequency of abnormal methylation of the 5' region of the gene and the rate of loss of heterozygosity in breast cancer samples equal correspondingly 38% and 50%. A germinal mutation in an evolutionarily conserved region of the *SEMA6B* gene was detected in one of the breast cancer patients.

Key words: breast cancer, tumor suppressors, chromosome segment 19p13.3, semaphorin, *SEMA6B*, DNA methylation, loss of heterozygosity, mutations