

Поиск мутаций в гене синдрома Блума (*BLM*) у пациентов с раком предстательной железы

Кунсбаева Г.Б.^{1,2*}, Гилязова И.Р.^{1,2}, Янкина М.А.², Климентова Е.А.², Павлов В.Н.³, Хуснутдинова Э.К.^{1,2}

¹ — Федеральное Государственное бюджетное учреждение высшего профессионального образования Башкирский государственный университет, Уфа; * kuncbaevagulnaz@mail.ru

² — Федеральное Государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, Уфа

³ — Федеральное Государственное бюджетное учреждение высшего профессионального образования Башкирский государственный медицинский университет, Уфа

Актуальность. Ген *BLM* кодирует белок, который относится к классу RecQ-хеликаз, участвует в поддержании стабильности генома. В случае гомозиготного или компаунд-гетерозиготного носительства мутаций в гене *BLM* развивается редкое аутосомно-рецессивное заболевание — синдром Блума, при котором значительно повышается риск развития онкологических заболеваний. **Цель:** Поиск мутаций в гене *BLM* у пациентов с раком предстательной железы. **Материалы и методы.** Проанализировано 124 образца ДНК, выделенных из периферической крови больных с аденокарциномой простаты из Республики Башкортостан. В работе применялись следующие методы: выделение ДНК из периферической крови методом фенольно-хлороформной экстракции, полимеразная цепная реакция; анализ кривых плавления с высокой разрешающей способностью (HRM); прямое секвенирование. Функциональную значимость выявленных изменений оценивали с использованием программ SIFT, PolyPhen-2, Mutation Assessor, Mutation Taster, CADD. **Результаты.** У пациентов с раком предстательной железы обнаружено 4 миссенс-мутации (с.C1237A (p.L413I), с.A1490C (p.Q497R), с.C2603T (p.P868L), с.G3961A (p.V1321I)) и ряд синонимичных замен (с.G3102A (p.T1034T), с.C3531A (p.A1177A)).

Ключевые слова: рак предстательной железы, ген синдрома Блума, мутации

Search for Bloom syndrome gene (*BLM*) mutations in prostate cancer patients

Kunsbaeva G.B.^{1,2*}, Gilyazova I.R.^{1,2}, Yankina M.A.², Klimentova E.A.², Pavlov V.N.³, Khusnutdinova E.K.^{1,2}

¹ — Bashkir State University, Department of Genetics, Ufa, Russia; * kuncbaevagulnaz@mail.ru

² — Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

³ — Bashkir State Medical University, Department of Urology, Ufa, Russia

Background: *BLM* gene belongs to the RecQ helicase family and has been implicated in the maintenance of genomic stability. Homozygous and compound heterozygous *BLM* gene mutations cause Bloom syndrome, an inherited recessive clinical syndrome, which is characterized by chromosomal instability and a predisposition to cancer. **The aim:** To reveal *BLM* gene mutations in prostate cancer patients. **Methods:** We analyzed 124 DNA samples of prostate cancer patients from the Republic of Bashkortostan and used the following methods: the DNA isolation from peripheral blood by phenol-chloroform extraction; polymerase chain reaction (PCR); high resolution melting (HRM) analysis; direct sequencing. The functional significance of the mutations was analyzed using the following programs: SIFT, PolyPhen-2, Mutation Assessor, Mutation Taster, CADD. **Results:** We revealed 4 missense mutations (с.C1237A (p.L413I), с.A1490C (p.Q497R), с.C2603T (p.P868L), с.G3961A (p.V1321I)) and several synonymous variants (с.G3102A (p.T1034T), с.C3531A (p.A1177A)) in the *BLM* gene.

Key words: prostate cancer, Bloom syndrome gene, mutations

Введение

Рак предстательной железы (РПЖ) — одно из наиболее часто встречающихся злокачественных новообразований мужского населения во всем мире [1]. Существенным фактором риска развития РПЖ является генетическая предрасположенность. Известно, что редкие мутации в генах *HOXB13*, *BRCA2*, *BRCA1*, *CHEK2*, *NBS1* и *BRIP1/FANCD1* вносят вклад в развитие РПЖ [2–5]. Кроме того, РПЖ может быть ассоциирован с редкими аутосомно-рецессивными синдромами, обусловленными гомозиготными или компаунд-гетерозиготными му-

тациями в генах, вовлеченных в репарацию ДНК, одним из которых является синдром Блума, характеризующийся высокой частотой разрывов и перестроек в хромосомах человека, что может увеличивать риск развития онкологических заболеваний [6]. Существует множество данных, которые доказывают то, что гетерозиготное носительство мутаций в гене *BLM* повышает риск развития колоректального рака, наследственных форм рака молочной и предстательной желез [7, 8].

Ген синдрома Блума (*BLM*) локализован на хромосоме 15, в области q26.1, состоит из 22 экзонов и кодирует белок, состоящий из 1417 аминокислот. Белок, кодируе-

мый геном *BLM*, относится к классу RecQ-хеликаз и является частью BRCA1-ассоциированного комплекса, который отвечает за репарацию повреждений ДНК [9]. По данным литературы известно, что у русских женщин с раком молочной железы в гене *BLM* обнаружена мутация с.1642C>T (p.Q548X), ассоциированная с повышением риска развития заболевания [10].

Материалы и методы

С целью поиска мутаций в гене *BLM* нами проанализировано 124 образца ДНК, выделенных из периферической крови неродственных больных с аденокарциномой простаты из Башкортостана. Выделение ДНК из периферической крови проводили методом последовательной фенольно-хлороформной экстракции [11]. В работе применялись следующие методы: полимеразная цепная реакция (ПЦР); анализ кривых плавления с высокой разрешающей способностью (HRM) на CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System с использованием флуоресцентного красителя EvaGreen; прямое секвенирование на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3100 согласно протоколу фирмы производителя. Функциональную значимость выявленных изменений проводили с использованием программ SIFT, PolyPhen-2, Mutation Assessor, Mutation Taster, CADD.

Результаты и обсуждение

В результате секвенирования образцов ДНК пациентов с РПЖ обнаружены 6 мутаций в гене *BLM*. Все изменения представляют собой однонуклеотидные замены, выявленные в гетерозиготном состоянии. Мутации в экзонной области включают две синонимичные (с.G3102A (p.T1034T), с.C3531A (p.A1177A)) и четыре

несинонимичные замены (с.C1237A (p.L413I), с.A1490G (p.Q497R), с.C2603T (p.P868L), с. G3961A (p.V1321I)).

В тринадцатом экзоне гена *BLM* у двух пациентов (1%) обнаружена патогенная миссенс-мутация p. P868L (таблица) в гетерозиготном состоянии. В исследовании Shastri et al. клетки, экспрессирующие мутантный вариант p. P868L гена *BLM*, показали повышенную частоту сестринских хроматидных обменов и замедленный ответ на повреждения ДНК, а также неэффективную репарацию индуцированных двуцепочечных разрывов [12]. Shastri et al. предположили, что замена пролина на гидрофобную аминокислоту лейцин нарушает гибкость и гидрофильность петли, ослабляя способность связывания с двуцепочечной ДНК [12].

В одиннадцатом экзоне гена *BLM* у одного пациента обнаружена патогенная миссенс-мутация с.C1237A (p.L413I) (таблица), приводящая к замене аминокислоты лейцина на изолейцин в 413 положении белка. О физиологической роли данной мутации, по данным литературы, пока ничего неизвестно. У одного больного с РПЖ обнаружена нуклеотидная замена с.A1490G (p.Q497R) в экзоне 7 гена *BLM*, которая приводит к аминокислотной замене глутамина на аргинин 497 положения белка. Отметим, что аминокислотный остаток глутамина относится к классу неполярных аминокислот, а аргинин — к щелочным полярным аминокислотам. Изменение полярности аминокислоты в данном случае может стать причиной конформационных изменений белковой молекулы *BLM*. Гетерозиготная мутация с.G3961A (p.V1321I) в 19 экзоне, приводящая к замене аминокислоты валина на изолейцин в 1321 позиции белка, была обнаружена у трех больных с РПЖ (2,4%). Один пациент являлся носителем двух гетерозиготных мутаций в гене *BLM* — p.P868L и p.V1321I. Thompson et al. провели полное секвенирование экзона при раке мо-

Таблица

Оценка функциональной значимости мутаций, обнаруженных у пациентов с раком предстательной железы в гене *BLM*

rs	Изменение в кодирующей части	Изменение в белке	Частота по базе данных 1000 Genomes (EUR)	Оценка функциональной значимости по различным базам данных				
				CADD ¹	SIFT ²	Mutation Taster ³	Mutation Assessor ⁴	PolyPhen2 ⁵
rs2227933	с.G3102A	р.T1034T	0,151158	13,42	0,995	—	—	—
rs2227934	с.C3531A	р.A1177A	0,133187	13,50	1,000	—	—	—
rs149754073	с.C1237A	р.L413I	0,000439	29,6	0,030	1,000,1,000, D	2,215,0,674, M	0,982, D
rs368547042	с.A1490G	р.Q497R	—	6,323	0,118	1,000,0,000, N	1,04,0,572, L	0,454, P
rs2227935	с.C2603T	р.P868L	0,0513179	34	0,005	1,000,0,000, P	2,395,0,689, M	0,81, P
rs7167216	с.G3961A	р.V1321I	0,0670927	0,603	0,383	0,0,1, P	0,455,0,521, N	0,01, B

Примечание. ¹CADD: чем выше значение, тем более патогенен вариант; ²Sift: D — disease causing; ³MutationTaster: A — disease causing automatic; D — disease causing; ⁴MutationAssessor: H — high; M — medium; L — low; ⁵PolyPhen2: D — Probably damaging (>=0,957); P — possibly damaging (0,447<=pp2_hdiv<=0,909).

лочной железы, в результате также были обнаружены мутации (с.G3102A (p.T1034T), с.C3531A (p.A1177A), с.A1490C (p.Q497R), с.G3961A (p.V1321I)) в гене *BLM* с высокой частотой [13]. Мутация p.Q548X в гене *BLM*, ассоциированная с 6-кратным увеличением риска развития рака молочной железы в России, Белоруссии и Украине, у пациентов с раком предстательной железы, не была обнаружена. Учитывая ее низкую частоту, необходимо дальнейшее проведение скрининга мутации p.Q548X в гене *BLM* на расширенной выборке пациентов.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Список литературы

- Каприн А.Д., Старинский В.В., Петровой Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2013 году. — М.: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «ФМИЦ им. П.А. Герцена» Минздрава России. — 2015. — 250 с. ISBN 978-5-85502-205-6.
- Cybulski C, Gorski B., Dkbniaik T. et al. NBS1 is a prostate cancer susceptibility gene // *Cancer research*. — 2004. — Vol. 64, — № 4. — P. 1215-1219.
- Ewing C., Ray M., Lange A.M. et al. Germline mutations in HOXB13 and prostate-cancer risk // *New England Journal of Medicine*. — 2012. — Vol. 366, — № 2. — P. 141-149.
- Kote-Jarai Z., Jugurnauth S., Mulholland S. et al. A recurrent truncating germline mutation in the BRIP1/FANCC gene and susceptibility to prostate cancer // *British journal of cancer*. — 2009. — Vol. 100, — № 2. — P. 426-430.
- Seppala E. H., Ikonen T., Mononen N. et al. CHEK2 variants associate with hereditary prostate cancer // *British journal of cancer*. — 2003. — Vol. 89, — № 10. — P. 1966-1970.
- Ellis N. A. Groden J., Ye T.Z. et al. The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases // *Cell*. — 1995. — Vol. 83, — № 4. — P. 655-666.
- Goss K.H., Risinger M.A., Kordich J.J. et al. Enhanced tumor formation in mice heterozygous for BLM mutation // *Science*. — 2002. Vol. 297, — № 5589. — P. 2051-2053.
- Gruber S.B., Ellis N.A., Scott K.K. et al. BLM heterozygosity and the risk of colorectal cancer // *Science*. — 2002. — Vol. 297, — № 5589. — P. 2013-2013.
- Futaki M., Liu J. M. Chromosomal breakage syndromes and the BRCA1 genome surveillance complex // *Trends in molecular medicine*. — 2001. — Vol. 7, — № 12. — P. 560-565.
- Sokolenko A.P., Iyevleva A.G., Preobrazhenskaya E.V. et al. High prevalence and breast cancer predisposing role of the BLM c. 1642 C> T (Q548X) mutation in Russia // *International Journal of Cancer*. — 2012. — Vol. 130, — № 12. — P. 2867-2873.
- Mathew C. G. P. The isolation of high molecular weight eukaryotic DNA // *Nucleic Acids*. — Humana Press, 1984. — P. 31-34.
- Shastri V.M., Schmidt K.H. Cellular defects caused by hypomorphic variants of the Bloom syndrome helicase gene BLM // *Molecular genetics & genomic medicine*. — 2016. — Vol. 4, — № 1. — P. 106-119.
- Thompson E.R., Doyle M.A., Ryland G.L. et al. Exome sequencing identifies rare deleterious mutations in DNA repair genes FANCC and BLM as potential breast cancer susceptibility alleles // *PLoS Genet*. — 2012. — Vol. 8, — № 9. — P. e1002894.