

УДК 575.852

ЭВОЛЮЦИОННАЯ ИСТОРИЯ SSX-СЕМЕЙСТВА ОНКОАНТИГЕНОВ ЧЕЛОВЕКА

© 2009 г. Е. Н. Шустрова¹, И. И. Артамонова^{2,3*}

¹Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119992

²Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991

³Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича Российской академии наук, Москва, 127994

Поступила в редакцию и принята к печати 25.02.2009 г.

Представлена к публикации М.С. Гельфандом

Онкоантигены (С/Т-антигены) – это эндогенные белки организма, которые синтезируются при нормальном развитии клеток зародышевого пути и плаценты, а также при развитии некоторых раковых опухолей. Они могут быть использованы в качестве мишеней при разработке противоопухолевой терапии. Семейство SSX – одно из семейств онкоантигенов. Мы исследовали эволюцию генов этого семейства с использованием методов сравнительной геномики. Локус семейства в геноме человека состоит из 11 генов, расположенных на X-хромосоме в двух отдельных регионах на расстоянии 4 млн. п. н. друг от друга. Анализ данных по экспрессии этих генов свидетельствует о том, что два из них являются псевдогенами. Сравнение локусов семейства SSX в геномах человека, шимпанзе и мыши позволило описать общую филогению семейства и восстановить эволюционную историю всего локуса в терминах элементарных геномных перестроек.

Ключевые слова: онкоантигены, С/Т-антигены, генное семейство, эволюция, сравнительная геномика, хромосомные перестройки.

EVOLUTIONARY HISTORY OF THE SSX FAMILY OF HUMAN C/T-ANTIGENS by E. N. Shustrova¹, I. I. Artamonova^{2,3*} (¹Department of Bioengineering and Bioinformatics, Moscow State University, Moscow, 119992 Russia; ²Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Science, Moscow, 119991 Russia; ³Kharkevich Institute for Information Transmission Problems, Russian Academy of Science, Moscow, 127994 Russia, *e-mail: irenart@gmail.com). C/T-antigens are endogenous proteins expressed in normal testis, ovary and placenta, or in a variety of tumors. Such expression pattern sets the C/T antigens as promising targets for cancer vaccines. The SSX family comprises several C/T antigens. Here we applied comparative genomics techniques to study the evolution of the SSX genes. The human genomic locus includes 11 genes localized on the X chromosome in two separate regions 4 Mb apart. The recent pseudogenization of two SSX genes was demonstrated using the available expression data. The comparative analysis of the human, chimpanzee and mouse genomic loci allowed us to describe the phylogeny of the family and to reconstruct the evolutionary history of the locus in terms of elementary events.

Key words: C/T-antigens, gene family, gene and genome evolution, comparative genomics, chromosome translocations.

Онкоантигены, или С/Т-антигены (Cancer/Testis-antigens), вызывают иммунный ответ в злокачественных опухолях, будучи при этом эндогенными белками организма [1]. В норме соответствующие гены экспрессируются только в клетках зародышевого пути и в плаценте, и их продукты могут быть использованы в качестве маркеров при разработке противоопухолевой терапии.

Одним из представителей семейств онкоантигенов является семейство SSX (Synovial Sarcoma X

breakpoint). Гены этих белков экспрессируются при синовиальной саркоме [2, 3]. До сих пор неизвестна их роль в развитии данной опухоли. Позднее, экспрессия генов этого семейства была показана также в клетках злокачественных опухолей других типов, а именно, при множественных миеломах [4, 5], фиброзных гистиоцитомах [6], гепатоклеточных карциномах [7], внутривенных холангиокарциномах [8], меланомах [9–11], лимфомах [10], нейробластомах [12], менингиомах и других опухолях головного мозга [13], а также при гемобластозах [14], раке яичников [10, 15, 16], костей и мягких тканей [17], эндо-

* Эл. почта: irenart@gmail.com

метрия и шейки матки [16], раке головы и шеи, кишечника и молочной железы [10]. Это определяет интерес исследователей к указанному семейству генов.

Первым представителем семейства *SSX* стал ген *SSX2*, идентифицированный как один из двух генов, которые участвуют в хромосомной перестройке t(X;18)(p11.2;q11.2), сопровождающей в 70% случаев развитие синовиальной саркомы [18]. Его партнер на хромосоме 18 – ген *SYT*, который кодирует активатор транскрипции. Вместе они образуют гибридный белок *SYT-SSX2*. Далее, при изучении хромосомных транслокаций обнаружили ген *SSX1*, который вместе с тем же партнером образует гибридный белок *SYT-SSX1* [19]. Последовательности остальных представителей семейства – генов *SSX3*, *SSX4*, *SSX5*, *SSX6*, *SSX7*, *SSX8* и *SSX9* – были определены или при секвенировании библиотек генов, или в результате поиска по базам данных генной экспрессии [11, 20–22]. Как оказалось, ген *SSX4* также вовлечен в хромосомную перестройку t(X;18)(p11.2;q11.2) [23]. Помимо этих девяти генов, найдено десять псевдогенов семейства. Все они, за исключением псевдогена *ΨSSX10*, расположены на хромосоме X [21].

Согласно экспрессионному анализу генов семейства *SSX*, гены белков *SSX1*, *SSX2*, *SSX3*, *SSX4*, *SSX5* и *SSX7* в норме экспрессируются только в тканях семенников. В тканях же почек, легких, кишечника, печени, матки, мозга, поджелудочной железы экспрессии не обнаружено. В клеточных линиях экспрессируются гены белков *SSX1*, *SSX2*, *SSX4*, *SSX5*, *SSX6* и *SSX7*; экспрессии же генов *SSX8* и *SSX9* не обнаружено ни в одной из исследуемых тканей или клеточных линий [10, 11, 21, 24].

Наиболее вероятная функция белковых продуктов генов этого семейства – репрессия транскрипции [24]; она связана с наличием в этих генах двух функциональных доменов – *KRAB* и *SSXR*D [25–28].

В данной работе мы исследовали эволюцию семейства онкоантигенов *SSX*, определив экзон-интронную структуру генов человека и сравнив локусы семейства *SSX* в геномах человека, шимпанзе, орангутана, макаки и мыши. В результате, мы описали общую филогению семейства и восстановили эволюционную историю каждого гена в отдельности и всего хромосомного локуса в терминах элементарных геномных перестроек.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Нуклеотидные последовательности генов и аминокислотные последовательности их продуктов, а также последовательности соответствующих мРНК и EST (Expressed Sequence Tags) анализировали, используя сервис UCSC Genome Browser, доступный на сайте <http://genome.ucsc.edu> [29]. Поиск по базам данных, доступных через этот сервис, а также первичные выравнивания найденных последовательностей

производили с помощью программы BLAT на том же сервере [30]. Для поиска далеких гомологов использовали программу blastp пакета программ BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) [31]. Множественные выравнивания последовательностей осуществляли с помощью программ CLUSTAL W [32] и T-COFFEE [33]. Филогенетические деревья строили, применяя программу MEGA4 [34].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экзон-интронная структура генов семейства *SSX* в геноме человека

Семейство *SSX* в геноме человека состоит из 11 генов, расположенных на X-хромосоме. В него включают также 10 псевдогенов, однако в этой работе мы сосредоточили свое внимание на потенциально функциональных генах. Все гены семейства имеют сходную экзон-интронную структуру, схематически представленную на рис. 1. Отмечены лишь незначительная вариабельность, например, в стартовых экзонах. Кроме того, имеются альтернативные изоформы генов *SSX2*, *SSX4* и *SSX5*, отличающиеся по включению кассетных экзонов. У гена *SSX3* также найдена изоформа, два последних экзона которой (6-7а и 6-7б) альтернативны двум последним экзонам основной изоформы (7 и 8). У гена *SSX6* выявлены неканонические донорные сайты сплайсинга в первом (1а) и седьмом (7) экзонах. В результате этого его изоформа, использующая альтернативный стартовый экзон (1б) и альтернативный донорный сайт сплайсинга в седьмом экзоне (7а), является, по-видимому, единственно функционирующей. Кодировочная последовательность во всех генах начинается со второго экзона и заканчивается в предпоследнем.

Наиболее подробному анализу подверглись гены *SSX8* и *SSX9*, экспрессии которых не наблюдали ни в одной из исследованных нормальных тканей или опухолей [21]. Ген *SSX9* представлен единственным вариантом (NM_174962 в базе данных RefSeq) и включает все восемь экзонов, общих для *SSX*-семейства (рис. 1). Первые пять экзонов этой последовательности подтверждены наличием EST DB029485 из библиотеки кДНК яичек, а экзоны со второго по седьмой подтверждены мРНК BC160077, аннотированной как “синтетическая конструкция”. Таким образом, в базах данных не обнаружено ни одного транскрипта, соответствующего полному гену. Кроме того, шестой экзон гена имеет неканонический донорный сайт сплайсинга, включающий динуклеотид АТ на 5'-границе интрона. Сплайсинг такого интрона не упоминается в литературе [35] и, по-видимому, невозможен, а сам ген – нефункционален.

К началу данного исследования в базах данных по экспрессии генов человека имелось две мРНК, аннотированные как *SSX8*. Это мРНК NM_174961 базы данных RefSeq и мРНК AK302291 базы данных Gen-

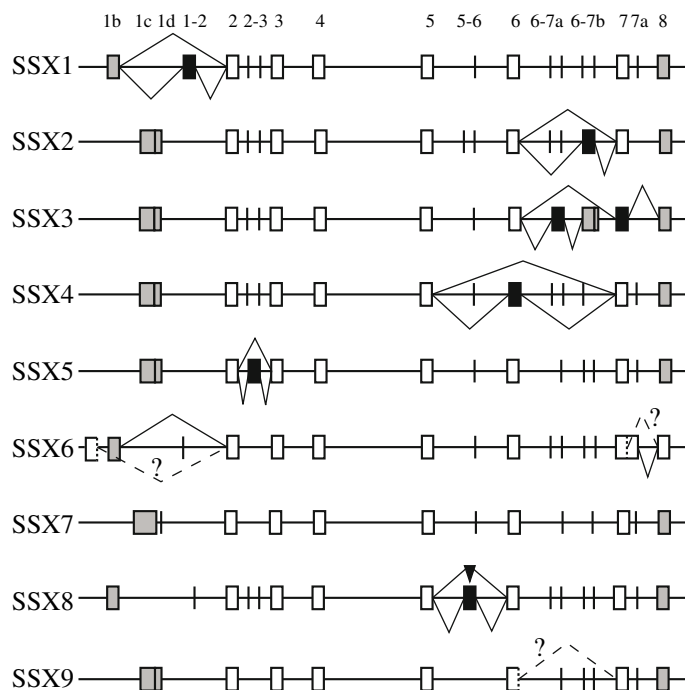


Рис. 1. Схема расположения экзонов в генах семейства SSX. Гомологичные экзоны расположены друг под другом. Стартовые и терминальные экзоны показаны серым, кассетные экзоны – черным, внутренние конститутивные экзоны – белым. Все экзоны пронумерованы в верхней части рисунка. В окрестностях кассетных экзонов пути сплайсинга, подтвержденные транскриптами, обозначены сплошными линиями. Пунктирными линиями в прямоугольниках показаны неканонические (по-видимому, нефункциональные) сайты сплайсинга, соответствующие им пути сплайсинга также показаны пунктиром и отмечены вопросительными знаками, как, возможно, артефактные. Консервативные сайты сплайсинга показаны вертикальными черточками, а гомологичные друг другу соединены вертикальными пунктирными линиями. Стоп-кодон в 5–6 экзоне аннотированной изоформы гена SSX8 показан черной стрелкой.

Bank. Первая из них включает все восемь основных экзонов гена SSX8, а вторая только первые шесть и дополнительный экзон 5–6, расположенный между пятым и шестым основными экзонами. Возможность экспрессии только первых (общих) четырех экзонов гена подтверждена последовательностями EST. Шестой экзон гена SSX8 содержит однонуклеотидную вставку, которая приводит к сдвигу рамки и появлению стоп-кодона в самом конце экзона этой мРНК. Так как данная мРНК включает также последовательности седьмого и восьмого экзонов, она является потенциальной мишенью для NMD-деградации [36] (и была удалена, по этой причине, из базы данных во время проведения данного исследования). Вторая мРНК гена SSX8 – AK302291 – содержит стоп-кодон в рамке считывания в середине предпоследнего дополнительного экзона 5–6, расстояние от которого до 3'-границы экзона составляет 152 н. (>55 н) и, таким образом, также является потенциальной мишенью для NMD-деградации. Обе мРНК гена SSX8, по-видимому, не транскрибируются.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что гены SSX8 и SSX9 представляют собой псевдогены, и эта “псевдогенизация”, видимо, произошла совсем недавно, так как бывшие кодирующие сегмен-

ты этих генов еще “не успели” приобрести дополнительных преждевременных стоп-кодонов.

Эволюция альтернативных сайтов сплайсинга SSX-генов

Семейства паралолических генов, появившиеся в результате недавних дупликаций, представляют собой уникальный объект для анализа эволюции сайтов сплайсинга, иллюстрируя одновременно несколько путей развития одних и тех же участков ДНК, часто – с различными исходами. Мы проанализировали все альтернативные сайты сплайсинга генов семейства SSX. Потенциальный сайт, который отличается от соответствующего консенсуса сайтов сплайсинга хотя бы на одну значимую позицию больше, чем функциональный сайт, рассматривался как разрушенный. Мы считали значимыми позиции [-3; +6] для донорного сайта и позиции [-15; +3] для акцепторного сайта сплайсинга. Сайт сплайсинга считали функциональным, если имеется изоформа, использующая этот сайт, транскрипция которой подтверждена экспериментальными данными. Все сохранившиеся потенциальные сайты сплайсинга отмечены на рис. 1. Здесь мы обсудим только наиболее яркие моменты.



Рис. 2. Карты локусов семейства генов *SSX* в геноме человека и в геноме шимпанзе.

Донорный сайт наиболее распространенного стартового экзона 1d сильнее (т.е. ближе к консенсусу), чем донорный сайт варианта первого экзона 1c. Расстояние между этими сайтами 44 н. Несмотря на то, что оба сайта имеются во всех далее упомянутых генах, в генах *SSX2*, *SSX3*, *SSX4*, *SSX5* и *SSX9* “выбирается” более сильный 3'-сайт, и лишь в гене *SSX7* активен 5'-вариант.

Из трех генов – *SSX1*, *SSX6* и *SSX8* – только в гене *SSX1* представлены оба сайта кассетного экзона 1–2: в гене *SSX1* представлен только акцепторный, а в гене *SSX8* – только донорный сайты. Это единственный кассетный экзон, в котором отсутствие экспрессии полностью определяется сохранностью сайтов (рис. 1). Все остальные экзоны, служащие кассетными для одного из генов семейства, сохраняют оба сайта, как минимум, еще в одном гене (рис. 1). Сколько-нибудь существенной экспрессии в этих случаях не наблюдается; возможно, это определяется лишь тем, что данных по этому, очень узкому спектру транскрипции исследуемых генов, пока недостаточно.

Единственная ген-специфичная замена А на G в позиции (–6) акцепторного сайта шестого экзона в гене *SSX4* не удаляет этот сайт от консенсуса (согласно консенсусу, позиция (–6) должна содержать пиримидин). Поэтому эта замена не может объяснить того, что в гене *SSX4* шестой экзон является кассетным, в то время как во всех остальных генах его экспрессия конститутивна (рис. 1).

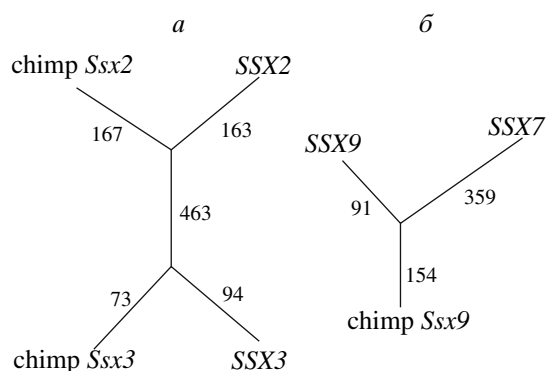


Рис. 3. Филогенетические деревья полных нуклеотидных последовательностей. *a* – Гены человека *SSX2* и *SSX3* и шимпанзе *Ssx2* и *Ssx3*. *б* – Гены человека *SSX9* и *SSX7* и шимпанзе *Ssx9*. Соответствующее число замен отмечено на ветвях деревьев.

Структура локуса в геномах человека и шимпанзе

Локус генома человека, содержащий гены семейства *SSX*, охватывает почти 5 млн. п.н. X-хромосомы. Он лежит на участке с координатами 47852032–52807342. Имеются две совсем недавние дубликации генов *SSX2* и *SSX4* и соответствующие им копии генов практически неразличимы. В геноме шимпанзе семейство *SSX* состоит из шести генов, расположенных на X-хромосоме в интервале с координатами 48431413–53122221. Порядок генов и их принадлежность к прямой или обратной цепи в обоих локусах показаны на рис. 2.

Экспансия семейства *SSX* происходила, вероятно, одновременно с расхождением шимпанзе и человека. Основные представители семейства уже присутствуют в геноме шимпанзе как отдельные гены. Принадлежность всех генов к прямой или обратной цепи совпадает, как и порядок, в котором они располагаются на хромосоме (за исключением генов *SSX1* и *SSX5*: в геноме шимпанзе они меняются местами). Помимо этого, в обоих локусах сохраняется интервал длиной 4 млн. п.н.

В то же время, не удается обнаружить копию гена *SSX6* в геноме шимпанзе, а пары генов *SSX7* и *SSX9* и также *SSX2* и *SSX3* представлены единичными генами. Парное сравнение этих генов шимпанзе с каждым из соответствующих двух ближайших генов человека и подробный филогенетический анализ геномных последовательностей показали, что это ортологи *SSX9* и *SSX3* (рис. 3). Ортологи генов *SSX7* и *SSX2*, по-видимому, были утеряны в процессе эволюции шимпанзе.

В геноме мыши семейство *SSX* также представлено несколькими генами. Филогенетическое дерево всех генов приматов и мыши распадается строго на две таксон-специфичные ветви (данные не представлены). Можно сделать вывод, что данное семейство распространялось независимо в отрядах грызунов и приматов. Видимо, у последнего общего предка приматов и грызунов семейство *SSX* было представлено только одним геном. Аналогичный пример независимого распространения в отрядах приматов и грызунов был ранее описан при изучении другого семейства онкоантигенов, *MAGE-A* [37].

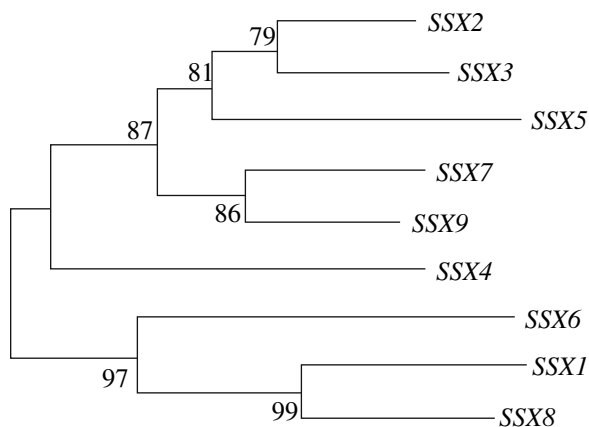


Рис. 4. Филогенетическое дерево полных нуклеотидных последовательностей генов семейства SSX человека. Числами показана бутстреп-поддержка соответствующего узла.

Эволюционная история локуса семейства SSX в терминах элементарных перестроек

Мы смоделировали эволюционную историю локуса семейства SSX в терминах элементарных хромосомных перестроек, исходя из структуры локуса в геномах человека и шимпанзе (рис. 2), а также на основе филогенетического дерева, построенного по нуклеотидным последовательностям генов человека (рис. 4). При этом мы полагали, что параллель-

ные пути в эволюции значительно менее вероятны, чем хромосомные дупликации и потери. Мы исходили также из того, что тандемные дупликации более вероятны, чем дупликации с перемещением в соседний локус. Восстановление событий идет от настоящего к прошлому, в том же направлении будем их и излагать. Общая схема описанных ниже событий представлена на рис. 5.

Копии генов SSX2 и SSX4 настолько близки, что невозможно различить транскрипционные продукты этих генов. Очевидно, что эти копии – результат совсем недавних дупликаций. Различия внутри каждой из этих пар генов заключаются лишь в числе повторов в поли(АС)- и поли(А)-треках. По имеющимся данным невозможно установить, какой ген дуплицировался раньше, а какой – позже. Обе эти пары копий – результат тандемных инвертированных дупликаций. Эти копии, во-первых, слишком близки, а, во-вторых, их нет в геноме шимпанзе. Поэтому время происхождения обеих этих дупликаций заведомо меньше времени расхождения видов *Homo sapiens* и *Pan troglodytes*, т.е. 5–6 млн. лет.

Ближайшими попарными родственниками различных генов являются пары генов SSX1 и SSX8, SSX9 и SSX7, SSX3 и SSX2 (рис. 4). Анализ их расположения в геноме, а также тот факт, что длина ветвей на филогенетических деревьях сопоставима, приводят к выводу, что эти пары – результат дупликации целого сегмента, включающего три гена. Эта дупли-

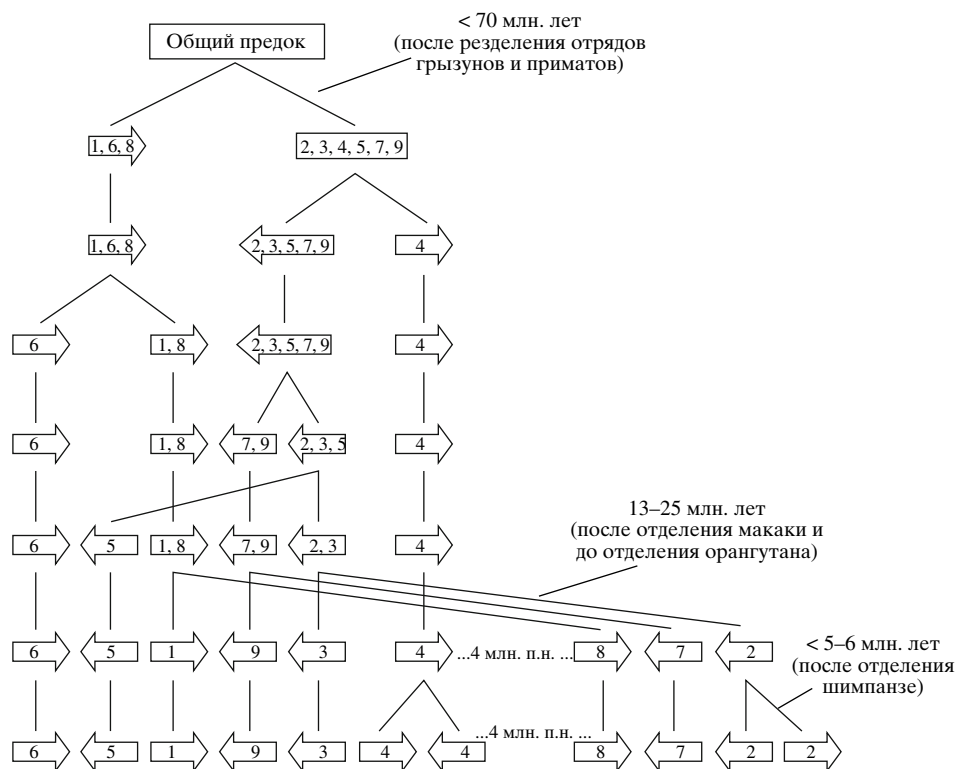


Рис. 5. Схема эволюционных событий, происходивших в локусе семейства SSX генома человека.

кация привела к встраиванию нового сегмента на расстоянии ~4 млн. п.н. от основного локуса семейства. Свидетельства об этой дупликации есть и в геноме шимпанзе, причем относительное расстояние между локусами такое же. Вновь встроены сегмент у обезьяны представлен только геном *SSX2*, что может быть результатом последующей потери подсегмента, содержащего гены *SSX8* и *SSX7*. Старая же копия сегмента представлена генами *SSX3* и *SSX9*, а ген *SSX1* отделен от них геном *SSX5*. Кроме последующих потерь и геномной перестановки, отсутствие генов, а также порядок соответствующих генов в геноме шимпанзе могут объясняться неточностями в процессе секвенирования или при последующей сборке контигов, так как описываемый регион содержит множество несеквенированных участков разного размера.

Сегмент, содержащий основные гены семейства *SSX*, дуплицирован также в геноме орангутана с сохранением относительного расстояния (данные не приведены), но не в геноме макака. Таким образом, возраст данной дупликации ограничен интервалом от 13 до 25 млн. лет.

До описанной дупликации сегмента все события происходили внутри небольшого хромосомного локуса. Ген-предшественник генов *SSX2*, *SSX3* и *SSX5* дуплицировался в прямом направлении со встраиванием нового сегмента через два гена от старой копии, образовав современный ген *SSX5* и ген-предшественник генов *SSX2* и *SSX3*. Ген-предшественник генов *SSX2*, *SSX3*, *SSX5*, в свою очередь, появился в результате предыдущей прямой тандемной дупликации, вторым результатом которой стало появление гена-предшественника генов *SSX7* и *SSX9*. Предыдущим событием, по-видимому, была прямая дупликация гена-предшественника генов *SSX1*, *SSX6* и *SSX8* с образованием гена *SSX6*. Мы утверждаем, что эта дупликация была тандемной, несмотря на то, что соответствующие гены сейчас разделяются геном *SPACA5*. В геноме человека этот ген представлен двумя копиями, в то время как в остальных, из известных, геномах приматов – только одной. Судя по геномному окружению, предковой является копия гена *SPACA5*, не входящая в *SSX*-локус, а копия, разделяющая сейчас гены *SSX6* и *SSX5*, внедрилась в описываемый локус после расхождения видов *Homo sapiens* и *Pan troglodytes*, т.е. значительно позже, чем обсуждаемая дупликация.

Предыдущей могла быть инвертированная тандемная дупликация гена-предшественника генов *SSX2*, *SSX3*, *SSX4*, *SSX5*, *SSX7* и *SSX9* с отделением гена *SSX4*. Наконец, самым первым событием, положившим начало распространению *SSX*-семейства в геноме приматов, по имеющимся данным, была тандемная дупликация, разделившая гены-предшественники генов *SSX1*, *SSX6* и *SSX8* и всех остальных генов семейства. Была ли эта дупликация прямой или обратной, сейчас невозможно установить, так

как неизвестно направление гена-предшественника генов *SSX2*, *SSX3*, *SSX4*, *SSX5*, *SSX7* и *SSX9*. Так как мы полагаем, что у последнего общего предка приматов и грызунов семейство было представлено одним геном, можно утверждать, что эта дупликация случилась менее 70 млн. лет назад.

Таким образом, мы попытались восстановить эволюционную историю хромосомного локуса семейства *SSX* на основе анализа представителей этого семейства в геномах приматов и мыши. Это позволяет представить картину формирования мультигенного семейства из единственного гена в течение менее чем 70 млн. лет. Исследования подобного рода позволяют пролить свет на фундаментальные механизмы появления и фиксации геномных дупликаций в процессе эволюции.

Авторы выражают благодарность М.Г. Гельфанду, Г.А. Базыкину и А.Ю. Панчину за плодотворные обсуждения в ходе работы.

Работа получила финансовую поддержку Президиума РАН по программам “Молекулярная и клеточная биология”, “Биологическое разнообразие” и “Фундаментальные науки – медицине”. Работа частично поддержана государственным контрактом № П 1376.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Scanlan M.J., Gure A.O., Jungbluth A.A., Old L.J., Chen Y.T. 2002. Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunol Rev.* **188**, 22–32.
2. Ladanyi M. 2001. Fusions of the *SYT* and *SSX* genes in synovial sarcoma. *Oncogene.* **20**, 5755–5762.
3. Ayyoub M., Brehm M., Mettez G., Talbot S., Dutoit V., Taub R.N., Keohan M.L., Gure A.O., Chen Y.T., Williamson B., Jungbluth A.A., Old L.J., Hesdorffer C.S., Valmori D. 2003. *SSX* antigens as tumor vaccine targets in human sarcoma. *Cancer Immun.* **3**, 13.
4. Andrade V.C., Vettore A.L., Felix R.S., Almeida M.S., Carvalho F., Oliveira J.S., Chaffaille M.L., Andriolo A., Caballero O.L., Zago M.A., Colleoni G.W. 2008. Prognostic impact of cancer/testis antigen expression in advanced stage multiple myeloma patients. *Cancer Immun.* **8**, 2.
5. Taylor B.J., Reiman T., Pittman J.A., Keats J.J., de Bruijn D.R., Mant M.J., Belch A.R., Pilarski L.M. 2005. *SSX* cancer testis antigens are expressed in most multiple myeloma patients: co-expression of *SSX1*, 2, 4, and 5 correlates with adverse prognosis and high frequencies of *SSX*-positive PCs. *J. Immunother.* **28**, 564–575.
6. Segal N.H., Blachere N.E., Guevara-Patiño J.A., Gallardo H.F., Shiu H.Y., Viale A., Antonescu C.R., Wolchok J.D., Houghton A.N. 2005. Identification of cancer-testis genes expressed by melanoma and soft tissue sarcoma using bioinformatics. *Cancer Immun.* **5**, 2.
7. Peng J.R., Chen H.S., Mou D.C., Cao J., Cong X., Qin L.L., Wei L., Leng X.S., Wang Y., Chen W.F. Expression of cancer/testis (CT) antigens in Chinese hepatocellular

- carcinoma and its correlation with clinical parameters. 2005. *Cancer Lett.* **219**, 223–232.
8. Utsunomiya T., Inoue H., Tanaka F., Yamaguchi H., Ohta M., Okamoto M., Mimori K., Mori M. 2004. Expression of cancer-testis antigen (CTA) genes in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* **11**, 934–940.
 9. dos Santos N.R., Torensma R., de Vries T.J., Schreurs M.W., de Bruijn D.R., Kater-Baats E., Ruiter D.J., Adema G.J., van Muijen G.N., van Kessel A.G. 2000. Heterogeneous expression of the SSX cancer/testis antigens in human melanoma lesions and cell lines. *Cancer Res.* **60**, 1654–1662.
 10. Türeci O., Chen Y.T., Sahin U., Güre A.O., Zwick C., Villena C., Tsang S., Seitz G., Old L.J., Pfreundschuh M. 1998. Expression of SSX genes in human tumors. *Int. J. Cancer.* **77**, 19–23.
 11. Güre A.O., Türeci O., Sahin U., Tsang S., Scanlan M.J., Jäger E., Knuth A., Pfreundschuh M., Old L.J., Chen Y.T. 1997. SSX: a multigene family with several members transcribed in normal testis and human cancer. *Int. J. Cancer.* **72**, 965–971.
 12. Chi S.N., Cheung N.K., Cheung I.Y. 2002. Expression of SSX-2 and SSX-4 genes in neuroblastoma. *Int. J. Biol. Markers.* **17**, 219–223.
 13. Lee M.H., Son E.I., Kim E., Kim I.S., Yim M.B., Kim S.P. 2008. Expression of cancer-testis genes in brain tumors. *J. Korean. Neurosurg. Soc.* **43**, 190–193.
 14. Fradet Y., Picard V., Bergeron A., LaRue H. 2005. Cancer-testis antigen expression in bladder cancer. *Prog. Urol.* **15**, 1303–1313.
 15. Valmori D., Qian F., Ayyoub M., Renner C., Merlo A., Gnjatic S., Stockert E., Driscoll D., Lele S., Old L.J., Odunsi K. 2006. Expression of synovial sarcoma X (SSX) antigens in epithelial ovarian cancer and identification of SSX-4 epitopes recognized by CD4 + T cells. *Clin. Cancer. Res.* **12**, 398–404.
 16. Hasegawa K., Koizumi F., Noguchi Y., Hongo A., Mizutani Y., Kodama J., Hiramatsu Y., Nakayama E. 2004. SSX expression in gynecological cancers and antibody response in patients. *Cancer Immun.* **4**, 16.
 17. Naka N., Joyama S., Tsukamoto Y., et al. 2005. Quantification of SSX mRNA expression in human bone and soft tissue tumors using nucleic acid sequence-based amplification. *J. Mol. Diagn.* **7**, 187–197.
 18. Clark J., Rocques P.J., Crew A.J., Gill S., Shipley J., Chan A.M., Gusterson B.A., Cooper C.S. 1994. Identification of novel genes, SYT and SSX, involved in the t(X;18)(p11.2;q11.2) translocation found in human synovial sarcoma. *Nature Genet.* **7**, 502–508.
 19. Crew A.J., Clark J., Fisher C., Gill S., Grimer R., Chand A., Shipley J., Gusterson B.A., Cooper C.S. 1995. Fusion of SYT to two genes, SSX1 and SSX2, encoding proteins with homology to the Kruppel-associated box in human synovial sarcoma. *EMBO J.* **14**, 2333–2340.
 20. de Leeuw B., Balemans M., van Kessel A.G. 1996. A novel Kruppel-associated box containing the SSX gene (SSX3) on the human X chromosome is not implicated in t(X;18)-positive synovial sarcomas. *Cytogenet. Cell Gene.* **73**, 179–183.
 21. Güre A.O., Wei I.J., Old L.J., Chen Y.T. 2002. The SSX gene family: characterization of 9 complete genes. *Int. J. Cancer.* **101**, 448–453.
 22. dos Santos N.R., de Bruijn D.R., van Kessel A.G. 2001. Molecular mechanisms underlying human synovial sarcoma development. *Genes Chromosomes Cancer.* **30**, 1–14.
 23. Skytting B., Nilsson G., Brodin B., Xie Y., Lundeberg J., Uhlen M., Larsson O. 1999. A novel fusion gene, SYT-SSX4, in synovial sarcoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **91**, 974–975.
 24. Naka N., Araki N., Nakanishi H., Itoh K., Mano M., Ishiguro S., de Bruijn D.R., Myoui A., Ueda T., Yoshikawa H. 2002. Expression of SSX genes in human osteosarcomas. *Int. J. Cancer.* **98**, 640–642.
 25. Lim F.L., Soulez M., Koczan D., Thiesen H.J., Knight J.C. 1998. A KRAB-related domain and a novel transcription repression domain in proteins encoded by SSX genes that are disrupted in human sarcomas. *Oncogene.* **17**, 2013–2018.
 26. Margolin J.F., Friedman J.R., Meyer W.K., Vissing H., Thiesen H.J., Rauscher F.J. 3rd. 1994. Krüppel-associated boxes are potent transcriptional repression domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 4509–4513.
 27. Pengue G., Calabró V., Bartoli P.C., Pagliuca A., Lania L. 1994. Repression of transcriptional activity at a distance by the evolutionarily conserved KRAB domain present in a subfamily of zinc finger proteins. *Nucleic Acids Res.* **22**, 2908–2914.
 28. Witzgall R., O’Leary E., Leaf A., Onaldi D., Bonventre J.V. 1994. The Kruppel-associated box-A (KRAB-A) domain of zinc finger proteins mediates transcriptional repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 4514–4518.
 29. Karolchik D., Baertsch R., Diekhans M., et al. 2003. The UCSC Genome Browser Database. *Nucleic Acids Res.* **31**, 51–54.
 30. Kent W.J. 2002. BLAT – The BLAST-like alignment tool. *Genome Res.* **12**, 656–664.
 31. Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389–3402.
 32. Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., et al. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* **23**, 2947–2948.
 33. Notredame C., Higgins D.G., Heringa J. 2000. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J. Mol. Biol.* **302**, 205–217.
 34. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24**, 1596–1599.
 35. Buset M., Seledtsov I.A., Solovyev V.V. 2000. Analysis of canonical and non-canonical splice sites in mammalian genomes. *Nucleic Acids Res.* **28**, 4364–4375.
 36. Weischenfeldt J., Lykke-Andersen J., Porse B. 2005. Messenger RNA surveillance: neutralizing natural nonsense. *Curr. Biol.* **15**, R559–562.
 37. Artamonova I.I., Gelfand M.S. Evolution of the exon-intron structure and alternative splicing of the MAGE-A family of cancer/testis antigens. 2004. *J. Mol. Evol.* **59**, 620–631.