

Заключение

Сравнительный анализ статуса метилирования генов RB1, p14ARF и p15INK4B в образцах опухолевой ДНК от пациенток с раком молочных желез демонстрирует высокую частоту аномального метилирования генов p14ARF и p15INK4B при нормальном эпигенетическом статусе гена RB1. Анализ литературных данных, доступных в отношении других форм рака, свидетельствует о том, что по крайней мере при лимфомах и при эпидермальном раке преимущественно наблюдается аналогичная ситуация. Не исключено, что такая комбинация эпигенотипов исследованных генов, с одной стороны, может объясняться более высокой частотой метилирования генов ингибиторов циклин-зависимых киназ, по сравнению с геном RB1, с другой – может указывать на существование особых эпигенетических механизмов дизрегуляции клеточного цикла и поддержания стабильности генома при канцерогенезе, которые запускаются уже на уровне ингибиторов циклин-зависимых киназ.

Работа выполнена в рамках интегративного проекта СО РАМН «Мо-

лекулярно-генетические механизмы формирования и прогрессии рака молочной железы: разработка критериев риска, прогноза клинического течения и чувствительности к химиотерапии на основании информативных маркеров опухоли и организма».

Литература

1. Аномальное метилирование некоторых генов-супрессоров при спорадическом раке молочной железы / Землякова В.В. [и др.] // Молекулярная биология. – 2003. – Т. 37. – С. 696-703.
2. Заболеваемость злокачественными новообразованиями в регионе Сибири и Дальнего Востока. Состояние онкологической службы и пути ее улучшения. / Е.Л. Чойнзонов [и др.] // Бюллетень СО РАМН. – 2004. – № 2. – С. 41-47.
3. Aberrant methylation of p16INK4a and deletion of p15INK4b are frequent events in human esophageal cancer in Linxian, China / E.P. Xing [et al.] // Carcinogenesis. – 1999. – Vol. 20. – P. 77-84.
4. Analysis of genetic and epigenetic processes that influence p14ARF expression in breast cancer. / J. Silva [et al.] // Oncogene. – 2001. – Vol. 20. – P. 4586-4590.
5. CpG island methylation STATus and mutation analysis of the RB1 gene essential promoter region and protein-binding pocket domain in nervous system tumour / P. Gonzalez-Gomez [et al.] // Brit. J. Cancer. – 2003. – Vol. 88. – P. 109-114.
6. Epigenetic abnormalities in cutaneous squamous cell carcinomas: frequent inactivation of the RB1/p16 and p53 pathways / K. Murao [et al.] // Brit. J. Dermatology. – 2006. – Vol. 155. – P. 999-1005.
7. Epigenetic silencing of multiple genes in primary CNS lymphoma. / C.C. Linda [et al.] // Int. J. Cancer. – 2006. – Vol. 119. – P. 2487-2491.
8. Hypermethylation-associated inactivation indicates a tumor suppressor role for p15. / J.G. Hannon [et al.] // Cancer Res. – 1996. – Vol. 56. – P. 722-727.
9. Hypermethylation-associated inactivation of p14(ARF) is independent of p16(INK4a) methylation and p53 mutational STATus / M. Esteller [et al.] // Cancer Res. – 2000. – Vol. 60. – P. 129-133.
10. Loss of pRb expression in pituitary adenomas is associated with methylation of the RB1 CpG island / D. J. Simpson [et al.] // Cancer Res. – 2000. – Vol. 60. – P. 1211-1216.
11. Methylation framework of cell cycle inhibitors in cirrhosis and associated hepatocellular carcinoma / M. Roncalli [et al.] // Hepatology. – 2002. – Vol. 36. – P. 427-432.
12. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation of CpG islands / J.G. Herman [et al.] // PNAS. – 1996. – Vol. 93. – P. 9821-9826.
13. p14ARF silencing by promoter hypermethylation mediates abnormal intracellular localization of MDM2 / M. Esteller [et al.] // Cancer Res. – 2001. – Vol. 61. – P. 2816-2821.
14. Prognostic significance of aberrant promoter hypermethylation of CpG islands in patients with diffuse large B-cell lymphomas / K. Amara [et al.] // Ann Oncol. – 2008. – Vol. 19. – P. 1774-86.
15. Progressive methylation during the serrated neoplasia pathway of the colorectum / S.M. Dong [et al.] // Mod. Pathology. – 2005. – Vol. 18. – P. 170-178.
16. Promoter hypermethylation profile of cell cycle regulator genes in pituitary adenomas / A. Yoshino [et al.] // J. Neurooncol. – 2007. – Vol. 83. – P. 153-62.
17. Promoter Hypermethylation of the RB1 Gene in Glioblastomas / M. Nakamura [et al.] // Laboratory Investigation. – 2001. – Vol. 81. – P. 77-82.

А.Р. Фарахтдинова, С.А. Федорова, Т.И. Николаева, П.М. Иванов, М.А. Бермишева, Т. Дюерк, Э.К. Хуснутдинова

АНАЛИЗ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ BRCA1, CHEK2, NBS1 У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ИЗ РЕСПУБЛИКИ САХА (ЯКУТИЯ)

УДК 616-092; 575.224

Проведен скрининг у больных раком молочной железы (РМЖ) (n=60) и контрольной группы (n=120) из Республики Саха (Якутия) на наличие мутаций 5382insC, 4153delA, C61G гена BRCA1, мутаций IVS2+1G>A, CHEK2dele9,10 (5kb), 1100delC гена CHEK2 и 657del5 гена NBN. Данные мутации в изученной выборке не обнаружены.

Ключевые слова: рак молочной железы, мутации, популяция.

We carried out screening of patients with breast cancer (n=60) and healthy population controls (n=120) of Republic Sakha (Yakutia) on presence of mutations 5382insC, 4153delA, C61G in BRCA1 gene, mutations IVS2+1 G>A, CHEK2dele9,10 (5kb), 1100delC in CHEK2 gene and 657del5 in NBN gene. These mutations have not been found in the cohort.

Keywords: breast cancer, mutations, population.

Введение

В последние годы в России отмечается тенденция к росту заболевае-

ФАРАХТДИНОВА Альбина Рауфовна – аспирант Института биохимии и генетики УНЦ РАН, e-mail: albina_far_81@mail.ru; **ФЕДОРОВА Сардана Аркадьевна** – д.б.н., зав. лаб. ЯНЦ КМП СО РАМН, sardaanafedorova@mail.ru; **НИКОЛАЕВА Татьяна Ивановна** – к.м.н., н.с. ЯНЦ КМП СО РАМН, usc@sakha.ru; **ИВАНОВ Петр Михайлович** – д.м.н., проф., зав. лаб. ЯНЦ КМП СО РАМН; **БЕРМИШЕВА Марина Алексеевна** – к.б.н., с.н.с. ИБГ УНЦ РАН, e-mail: marina_berm@mail.ru; **ДЮЕРК Тило** – Ганноверская медицинская школа, г. Ганновер, Германия; **ХУСНУТДИНОВА Эльза Камильевна** – д.б.н., проф., зав. отделом генетики ИБГ УНЦ РАН, ekkh@anrb.ru.

мости раком молочной железы (РМЖ). Риск возникновения заболевания в течение жизни оценивается в среднем у женщин 11%. Изучение распространения генетических маркеров предрасположенности к РМЖ в популяциях России дает необходимую информацию для скрининговых исследований, ранней диагностики и профилактики данной патологии.

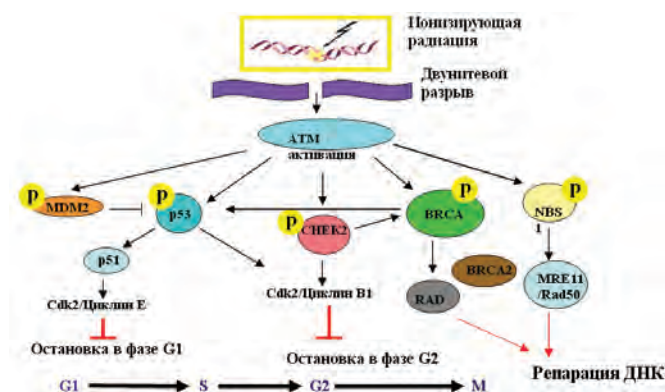
Рак молочной железы в Республике Саха (Якутия) в структуре онкологической заболеваемости (19,2%) и смертности (12,8%) занимает лидирующие позиции. Стандартизованные показатели заболеваемости и смертности в 1,4 и 1,5 раза ниже российского уровня и составляют 28,5±1,2 и 11,7±1,5

на 100000 населения соответственно. Средний возраст заболевших РМЖ составил 56 лет [4].

На сегодняшний день установлено, что мутации в генах BRCA1, BRCA2, CHEK2 и NBS1 приводят к развитию РМЖ. Продукты этих генов участвуют в процессах репарации ДНК, регуляции клеточного цикла, дифференцировки клеток, апоптоза (рисунок).

Анализ структурных изменений в этих генах у женщин с отягощенным семейным анамнезом может способствовать ранней диагностике заболевания.

На сегодняшний день молекулярно-генетические исследования по изучению РМЖ в Республике Саха не про-



Сигнальные пути, вовлеченные в процесс репарации радиационно-индуцированных повреждений ДНК

водились. Исходя из того факта, что в генофонде данной этнической группы присутствует компонент, характерный для народов Восточной Европы [5], мы провели анализ мутаций, встречающихся в популяциях Европы.

Материалы и методы

Материалом нашего исследования явились образцы ДНК пациенток с РМЖ (n=60), находившихся на стационарном лечении в Якутском республиканском онкологическом диспансере. У исследуемой группы больных диагноз был верифицирован. Данные о каждой пациентке заносились в специально разработанную нами формализованную карту (ФК), на основании которой создана компьютерная база данных. Возраст пациенток колеблется от 27 до 77 лет. Выборки больных РМЖ и здоровых доноров по этнической принадлежности относятся к якутам. Средний возраст манифестации заболевания составил 43,5 года (от 27 до 77 лет). У 50% больных репродуктивная функция сохранена. Данные о наличии семейных случаев в анамнезе у больных РМЖ отсутствуют. Преобладающей гистологической формой является инфильтрирующая карцинома (28%) и аденокарцинома (12%). По клиническим стадиям на первом месте II стадия -64%, на втором - III стадия -12%. Наличие метастаз в лимфоузлах обнаружено в 50% случаев. В качестве контрольной группы использовались образцы ДНК здоровых доноров (n=120), без онкологического диагноза.

ДНК выделяли из лимфоцитов периферической крови стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции. Определение мутаций проводили методами аллель-специфичной полимеразной цепной реакции (ПЦР), ПДРФ-анализа (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов).

Результаты и обсуждение

Существенная роль в развитии рака молочной железы отводится генам BRCA1, CHEK2, NBN, вовлеченным в процесс репарации радиационно-индуцированных повреждений ДНК. Наличие мутаций в этих генах может привести

к ошибкам репарации ДНК и, соответственно, к возникновению опухолей.

Мутации в генах BRCA1 характеризуются высокой пенетрантностью. Риск возникновения РМЖ у носителей данных мутаций достигает 50-90% в течение жизни [14, 17]. В разных регионах и этнических группах спектр и частота мутаций гена BRCA1 варьирует. Мутации 5382insC и 6174delT гена BRCA1 были обнаружены в большинстве семей с РМЖ или яичников у евреев ашкенази [17, 18]. Мутация 5382insC широко распространена в странах Центральной и Восточной Европы [2, 3]. Например, в выборке больных РМЖ из Республики Башкортостан она встречается с частотой не более 4 % [1]. Мутация C61G гена BRCA1 обнаружена в Польше, Литве, Белоруссии и Латвии [17]. В азиатских популяциях были обнаружены мутации в гене BRCA1 у сингапурцев (8,6% n=70), китайцев (3,8% n=130), японцев (0,8% n=1000) [16, 20]. Спектр мутаций в гене BRCA1 в азиатских популяциях отличается. У корейцев встречаются мутации L63X, 2509delAA гена BRCA1 [16, 12]. У китайцев в гене BRCA1 обнаружены мутации 2372delTG, 1082delG, 1100delAT [16, 20]. В Таиланде и Малайзии обнаружена мутация 3300delA BRCA1 [20]. Для большинства носителей мутаций гена BRCA1 отмечается ранний возраст манифестации заболевания (до 40 лет).

Мутации 5382insC, 4153delA, C61G в гене BRCA1, характерные для европейской популяций, в выборке больных РМЖ и контрольной группе якутов не обнаружены.

CHEK2 (cell-cycle checkpoint kinase) является ключевым медиатором, участвующим в процессах репарации ДНК или апоптоза. Предполагают, что герминальные мутации CHEK2 ассоциированы с раком молочной железы. В частности, мутация 1100delC была

определена как низкопенетрантный аллель РМЖ [10]. Гетерозиготные носители данной мутации имеют повышенный риск развития (в 2-3 раза) онкологического заболевания. Мутация CHEK2 1100delC присутствует у 0.2-1.5% жителей Европы и Северной Америки [22]. В популяциях Азии (у корейцев (n=493), сингапурцев (n=94), и китайцев (n=74)) мутация 1100delC гена CHEK2 не обнаружена [6, 12]. Мутации IVS2+1G>A и CHEK2dele9,10 (5kb) выявлены у поляков, белорусов, чехов и немцев [10, 22]. На сегодняшний день значимость данных полиморфных вариантов гена CHEK2 в развитии РМЖ в азиатских популяциях не выяснена. В выборке больных РМЖ из Китая обнаружена миссенс мутация 1111C>T (His371Tyr) [12].

Мы провели скрининг мутаций IVS2+1G>A, CHEK2dele9,10 (5kb), 1100delC в гене CHEK2, у больных РМЖ из Республики Саха (Якутия) и в контрольной группе. Данные мутации не были обнаружены в изученной выборке.

Ген NBN (NBS1, Nijmegen Breakage syndrome) участвует в процессах сохранения хромосомной стабильности, включая чувствительность к двухцепочечным разрывам ДНК, регуляции клеточного цикла [11]. Зародышевые мутации в гене NBN в гомозиготном состоянии приводят к возникновению синдрома Ниймегена, который является аутосомно-рецессивным заболеванием, характеризующийся микроцефалией, замедленным ростом, иммунной недостаточностью, и предрасположенностью к раку [7]. «Founder» мутация 657del5 гена NBN встречается в популяциях России и Восточной Европы [7, 8].

В исследуемой нами выборке больных РМЖ и контрольной группе мутация 657del5 гена NBN не обнаружена.

Тот факт, что мутации, характерные для европейских популяций, не обнаружены у больных РМЖ из Республики Саха (Якутия), можно объяснить несколькими причинами: во-первых, исследуемые мутации могут быть не характерны для популяции якутов, во-вторых, наша выборка представляет собой небольшое количество больных РМЖ (n=60), в-третьих, отсутствуют исследования в группах больных РМЖ с отягощенным семейным анамнезом. Полученные результаты соответствуют данным о выраженности восточно-евразийского компонента и низком содержании западноевразийских линий мтДНК и Y-хромосомы в генофонде якутов (10%) [5].

Заключение

Таким образом, мутации, характерные для народов Восточной Европы, не выявлены у больных якутского этнического происхождения. Необходимо проведение дальнейшего поиска мутаций, специфичных для якутов, с целью разработки подходов ДНК-диагностики и профилактики рака молочной железы в Республике Саха.

Работа проводилась при поддержке гранта РГНФ 08-06-00033а.

Литература

1. Бермишева М.А. Частота выявления мутации 5382insC гена BRCA1 / М.А. Бермишева, Г.Ф. Зиннатуллина, Э.К. Хуснутдинова // Вопросы онкологии. - 2008. - Т. 54, №1. - С. 31-34.
2. Карпухин А.В. Наследственная предрасположенность к раку молочной железы / А.В. Карпухин [и др.] // Медицинская генетика. - 2002. - Т. 6, №6. - С. 254-259.
3. Мандельштам М.Ю. Молекулярно-генетический анализ моногенных форм атеросклероза и рака молочной железы у жителей Санкт - Петербурга: автореф. дисс. д-ра биол. наук / М.Ю. Мандельштам. - СПб. - 2005.
4. Николаева Т.И. Рак молочной железы в условиях крайнего севера. Анализ эффективности онкологической помощи: автореф. дисс. канд. мед. наук / Т.И. Николаева. - Томск, 2007.
5. Федорова С.А. Этногеномика коренных народов республики Саха (Якутия): автореф. дисс. д-ра биол. наук / Федорова С.А. - М., 2008.
6. Ann S., Lee G. CHEK2*1100delC Screening of Asian Women With a Family History of Breast Cancer Is Unwarranted / S. Ann, G. Lee // Supported by the Sing Health Cluster Research Grant. - 2001 P. 313-318.
7. Nijmegen Breakage Syndrome mutations and risk of breast cancer / Bogdanova N. [et al.] // Int. J. Cancer, 2008. P. 802-806.
8. Buslov K. NBS1 657del5 mutation may contribute only to a limited fraction of breast cancer cases in Russia / K. Buslov, A. Iyevleva, E. Chekmariova // Int. J. Cancer, 2004. P. 585-589.
9. Chen W. Breast Cancer Low-Penetrance Allele 1100delC in the CHEK2 Gene : Not Present in the Chinese Familial Breast Cancer Population / W. Chen, S. Yurong, N. Liansheng // Journal of Clinical Oncology, Vol 26. - 2008: P. 419-422.
10. A novel founder CHEK2 mutation is associated with increased proSTATE cancer risk / Cybulski C. [et al.] // Cancer Res, 2004. P. 677-679.
11. Digweed M. Nijmegen breakage syndrome: clinical manifestation of defective response to DNA double-strand breaks / M. Digweed, K. Sperling // DNA Repair, 2004. P.1207-1214.
12. The CHEK2 1100delC mutation is not present in Korean patients with breast cancer cases tested for BRCA1 and BRCA2 mutation / H. Doo [et al.] // Breast Cancer Res Treat, 2008. P. 569-573.
13. Gatti R. Ataxia-telangiectasia. In: Vogelstein B, Kinzler KW (eds) The genetic basis of human cancer / R. Gatti // McGraw-Hill, New York, 2002. P. - 239-266.
14. Grzybowska E. High frequency of recurrent mutations in the BRCA1 and BRCA2 in Polish families with breast and ovarian cancer / Grzybowska E. [et al.] // Hum. Mutat, 2000. V.16. P. 482-490.
15. Khoo U. Recurrent BRCA1 and BRCA2 germline mutations in ovarian cancer: a founder mutation of BRCA1 identified in the Chinese population / U. Khoo [et al.] // Hum Mutat, 2002. P. 307-308.
16. Liede A. Hereditary Breast and Ovarian Cancer in Asia. Genetic Epidemiology of BRCA1 and BRCA2 / A. Liede, A. Narod // Hum. Mutat, 2002. P. 413-424.
17. Mitchell G. Mammographic density and breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers / G. Mitchell [et al.] // Cancer Res. - 2006. - Vol. 66. - P. - 1866-1872.
18. Pohlreich P. High proportion of recurrent germline mutations in the BRCA1 gene in breast and ovarian cancer patients from the Prague area / Pohlreich P. [et al.] // Breast Cancer Research. - 2005. V.7, № 5. P. 728-736.
19. Song C. The prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in eastern Chinese women with breast cancer / C. Song [et al.] // Cancer Res Clin Oncol. - 2006. P. 617-626.
20. Tang N. Prevalence of breast cancer predisposition gene mutations in Chinese women and guidelines for genetic testing / N. Tang [et al.] // Clin Chim Acta. - 2001. P.179-185.
21. Van der Looij M. Prevalence of founder BRCA1 and BRCA2 mutations among breast and ovarian cancer patients in Hungary / M. Van der Looij [et al.] // Int. J. Cancer, 2000. V.86. P. 737-740.
22. Walsh T. Spectrum of mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2 and TP53 in families at high risk of breast cancer / T. Walsh [et al.] // JAMA. - 2006. - Vol. - 295. P. - 1379-1388.

Ю.Ю. Федорова, А.С. Карунас, О.А. Гра, Н.Н. Рамазанова, Л.Л. Гурьева, Э.И. Эткина, И.В. Голденкова-Павлова, Э.К. Хуснутдинова

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ СИСТЕМЫ БИОТРАНСФОРМАЦИИ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ У ТАТАР

УДК: 577.21

С помощью аллель-специфичной гибридизации на биочипе определены частоты генотипов и аллелей полиморфных локусов генов биотрансформации ксенобиотиков (*CYP1A1*, *CYP2D6*, *GSTT1*, *GSTM1*, *MTHFR*, *CYP2C9*, *CYP2C19* и *NAT2*) у больных бронхиальной астмой и здоровых индивидов татарской этнической принадлежности. Выявлены маркеры повышенного риска развития астмы – аллели *NAT2*481T*, *MTHFR*677C* и генотип *NAT2*481T/T*.

Ключевые слова: бронхиальная астма, полиморфный вариант, ассоциация, биологические микрочипы, гены системы биотрансформации.

Using allele-specific hybridization on the biochip the frequencies of xenobiotic-metabolizing gene polymorphisms (*CYP1A1*, *CYP2D6*, *GSTT1*, *GSTM1*, *MTHFR*, *CYP2C9*, *CYP2C19* и *NAT2*) in patients with bronchial asthma and controls of Tatar ethnicity have been determined. It has been shown that *NAT2*481T/T* genotype and *NAT2*481T*, *MTHFR*677C* alleles are markers of asthma risk.

Keywords: bronchial asthma, polymorphism, association, oligonucleotide biochips, xenobiotic-metabolizing genes.

Собранные за последние 20 лет данные свидетельствуют о существ-

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН: **ФЕДОРОВА Юлия Юрьевна** – аспирант; e-mail: fedorova-y@yandex.ru, **КАРУНАС Александра Станиславовна** – к.м.н., с.н.с., **ХУСНУТДИНОВА Эльза Камильевна** – д.б.н., проф., зав. отделом молекулярной генетики человека. Кафедра детских болезней Башкирского гос. мед. ун-та: **РАМАЗАНОВА Наиля Назыфовна** – к.м.н., ассистент, **ГУРЬЕВА Лариса Львовна** – к.м.н., доцент, **ЭТКИНА Эсфирь Исаковна** – д.м.н., проф., зав. кафедрой, Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН: **ГРА Ольга Алексеевна** – к.б.н., н.с., **ГОЛДЕНКОВА-ПАВЛОВА Ирина Васильевна** – д.б.н., зав. группой биохимической генетики.

вовании взаимосвязи между генетическими вариациями в геноме и возникновением различных заболеваний [5]. Существуют гены, полиморфизм в которых коррелирует с рядом патологий, а также с вариабельностью в отношении метаболизма целого спектра лекарственных препаратов, потенциальных канцерогенов и ксенобиотиков. К таким генам относятся гены системы биотрансформации, определяющие индивидуальную чувствительность организма к факторам внешней среды. На сегодняшний день доказано, что полиморфные варианты генов детоксикации ксенобиотиков обуславливают наследственную предрасположенность к множеству многофакторных

заболеваний, в том числе и к аллергическим [9, 11, 16]. Бронхиальная астма (БА) принадлежит к числу наиболее распространенных хронических воспалительных заболеваний. В мире среди взрослого населения БА встречается с частотой 1-18% и почти вдвое чаще регистрируется у детей [2]. В настоящей работе нами проведено исследование 13 полиморфных локусов в восьми генах биотрансформации ксенобиотиков: *CYP1A1* (4887C>A, 4889A>G, 6235T>C), *CYP2D6* (1934G>A), *GSTT1* (делеция), *GSTM1* (делеция), *MTHFR* (677C>T), *CYP2C9* (430C>T, 1075C>T), *CYP2C19* (681G>A) и *NAT2* (481C>T, 590G>A, 857G>A) у больных БА и здоровых индивидов татарской этнической