

РОЛЬ ГЕНОВ *HMMR* И *TP53* В ГЕНЕЗЕ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**В.Н. КИПЕНЬ, Г.А. ПИСАРЧИК, С.Б. МЕЛЬНОВ***Международный государственный экологический университет им. А.Д. Сахарова,
г. Минск, Республика Беларусь*

Введение. В последнее время все больше внимания уделяется поиску рак-ассоциированных генотипов в рамках полногеномных исследований (GWAS – Genome-wide association study). В то же время продолжают исследования по анализу роли уже известных патогенетически значимых полиморфных вариантов генов. Так, использование биоинформатических методов (например, MDR (Multifactor dimensionality reduction) или метод нейронных сетей) позволяет с новых позиций взглянуть на известные закономерности в механизмах канцерогенеза. Pujana et al. была использована стратегия нейросетевого моделирования для определения генов, потенциально связанных с повышенным риском развития рака молочной железы (РМЖ) [1]. В данном исследовании была показана вовлеченность гена *HMMR* (hyaluronan-mediated motility receptor), наряду с *SMC3* (structural maintenance of chromosomes 3) и *MAD1L1* (MAD1 mitotic arrest deficient-like 1), в процессы митоза. В частности, *SMC3* входит в состав мультимерного Cohesin-комплекса, который скрепляет сестринские хроматиды во время митоза, что приводит к надлежащему расхождению хромосом, а *MAD1L1* входит в состав белкового комплекса, предотвращающего наступление анафазы до образования правильно собранной метафазной пластинки [2,3]. В этой же работе была показана связь *HMMR* с комплексом *BRCA1-BARD1* (breast cancer 1 gene; brca1-associated ring domain 1), а также с одним из ключевых регуляторов систем поддержания геномной стабильности *AURKA* (serine/threonine protein kinase 15). Роль некоторых полиморфных вариантов в гене *HMMR* была продемонстрирована в работе Kalmyrzaev B. et al. [4], а также в исследовании Pujana et al. [1].

Роль гена *TP53* в развитии онкопатологии известна давно, а первые исследования, посвященные связи однонуклеотидного полиморфизма (ОНП) R72P (rs1042522) с риском развития РМЖ и последующей выживаемостью в зависимости от проводимых курсов лучевой и химиотерапии, были проведены более десяти лет назад [5–7].

В работе отражены данные о связи ОНП V353A (*HMMR*, rs299290) и R72P (*TP53*, rs1042522) с риском развития РМЖ и с некоторыми клинико-морфологическими характеристиками опухоли.

Материалы и методы. В исследование были включены 146 пациентов с молатеральным РМЖ. Группа билатерального РМЖ составила: 2 случая синхронного билатерального РМЖ (временной критерий синхронности билатерального рака молочной железы составил не более 12 месяцев [8]) и 7 случаев метакронного билатерального РМЖ. Средний возраст пациентов с молатеральным РМЖ на момент возникновения опухоли составил 43,2±5,9 лет (возрастной интервал – 24–54 лет), пациентов с билатеральными формами РМЖ – 39,8±5,0 лет (возрастной интервал – 33–48 лет).

В группу сравнения вошли 123 условно здоровых пациента без онкологической патологии в анамнезе на момент забора крови, средний возраст составил $39,6 \pm 5,1$ лет (возрастной интервал – 25–52 года). Группа сравнения соответствовала по возрасту и этническому составу выборке больных РМЖ.

Все участники исследования подписали информированное согласие на проведение молекулярно-генетических исследований.

Все образцы ДНК были выделены из лейкоцитов периферической крови с помощью наборов «ДНК–экспресс кровь» НПФ Литех (РФ), а также с помощью метода водно–карбинольной экстракции по протоколу Helene C. Johanson с модификациями [9].

Анализ ОНП V353A (rs299290) в гене *HMMR*, а также P72R (rs1042522) в гене *TP53* проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) на приборе PeqLab Primus 96 Advanced (EU, Germany) с последующей обработкой соответствующими рестриктазами (метод полиморфизма длин рестрикционных фрагментов – ПДРФ). Последовательности олигонуклеотидов и характеристики ПЦР–продуктов и рестриктов (с указанием температуры отжига (T_a) и используемых рестриктаз фирмы NEB) представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Последовательности олигонуклеотидов, используемых в ПЦР

| Ген/ полиморфизм (rs) | Последовательность праймера 5'>3' | T_a , °C | Метод* | Размер рестриктов (п.о.) |
|---------------------------------|--|------------|-----------------|---|
| <i>TP53</i> P72R (rs1042522) | F 5'–AACTGACCGTGCAAGTCACA–3' R 5'–ACCCATCTACAGTCCCCCTT–3' | 56 | ПДРФ (BstUI) | CC (298) GG (131,167) CG (131,167,298) |
| <i>HMMR</i> V353A (rs299290) | F 5'–ACCTCACAATGCCATTCCAA–3' R 5'–TTGCTTGACCAGCCTTTCAG–3' | 56 | ПДРФ (MseI) | CC (70,134) CT (29,70,105,134) TT (29,70,105) |

* – ПДРФ – метод полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (приведена эндонуклеаза рестрикции)

Разделение аллелей осуществляли в 10% неденатурирующем полиакриламидном геле (ПААГ) с последующей окраской бромистым этидием (рисунок 1).

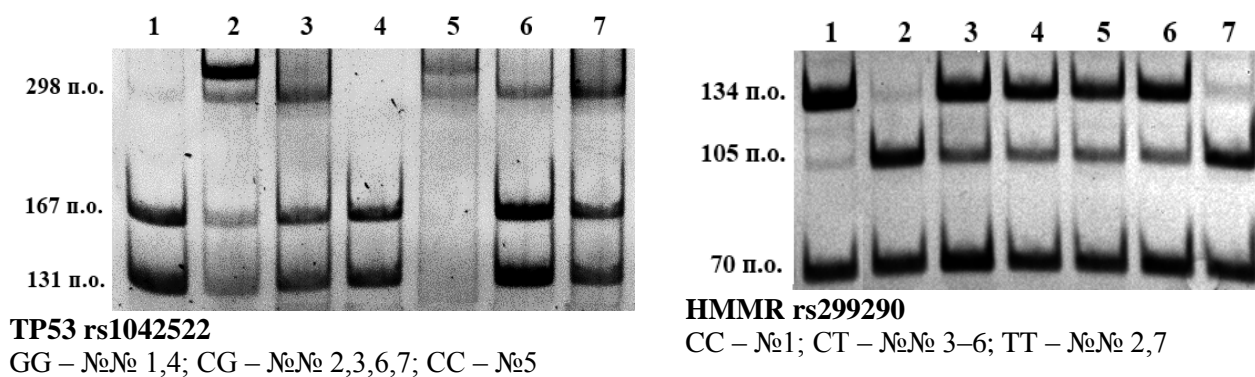


Рисунок 1 – Результаты ПААГ–электрофореза для исследуемых полиморфизмов

Обработка полученных данных выполнялась с использованием пакета программ «IBM SPSS Statistics 20 for Windows». Применялся критерий χ^2 (при $n < 5$ – точный критерий). Обсуждаются результаты с достоверностью различий при $p < 0,05$ и с тенденцией различий при $p < 0,1$.

Результаты и обсуждение. Нами была проанализирована распространенность генотипов по указанным выше ОНП среди пациентов с клинически верифицированным диагнозом РМЖ и группой сравнения. При этом были сформированы 2 подгруппы РМЖ: «Все случаи РМЖ» – неклассифицированная выборка, включающая все случаи РМЖ в данном исследовании; «Монолатеральный РМЖ» – выборка, содержащая только случаи монолатеральных форм РМЖ.

В результате анализа не было выявлено статистически значимых различий – таблица 2. Так, распространенность минорных аллелей в исследуемых выборках (случаи РМЖ и группа сравнения) сопоставима.

Таблица 2 – Результаты генотипирования по двум исследуемым полиморфизмам

| Ген/ полиморфизм | Генотип/ аллель | Кол-во пациентов, относительная частота, % (абс. частота) | | P* |
|---------------------------------|--------------------|--|--------------------------|----|
| | | Основная группа | Группа сравнения (n=123) | |
| «Все случаи РМЖ» (n=155) | | | | |
| <i>TP53</i> P72R (rs1042522) | CC | 7,1% (11/155) | 7,3% (9/123) | NS |
| | CG | 41,9% (65/155) | 49,6% (61/123) | |
| | GG | 51,0% (79/155) | 43,1% (53/123) | |
| | аллель С | 28,1% | 32,1% | NS |
| | аллель G | 71,9% | 67,9% | |
| <i>HMMR</i> V353A (rs299290) | TT | 49,0% (76/155) | 44,7% (55/123) | NS |
| | TC | 41,9% (65/155) | 50,4% (62/123) | |
| | CC | 9,0% (14/155) | 4,9% (6/123) | |
| | аллель T | 70,0% | 69,9% | NS |
| | аллель C | 30,0% | 30,1% | |
| «Монолатеральный РМЖ» (n=146) | | | | |
| <i>TP53</i> P72R (rs1042522) | CC | 7,5% (11/146) | 7,3% (9/123) | NS |
| | CG | 42,5% (62/146) | 49,6% (61/123) | |
| | GG | 50,0% (73/146) | 43,1% (53/123) | |
| | аллель С | 28,8% | 32,1% | NS |
| | аллель G | 71,2% | 67,9% | |
| <i>HMMR</i> V353A (rs299290) | TT | 47,9% (70/146) | 44,7% (55/123) | NS |
| | TC | 43,2% (63/146) | 50,4% (62/123) | |
| | CC | 8,9% (13/146) | 4,9% (6/123) | |
| | аллель T | 69,5% | 69,9% | NS |
| | аллель C | 30,5% | 30,1% | |

* – показаны статистически значимые различия [NS (not significant) – статистически значимых различий не выявлено], использовали критерии χ^2 , при $n < 5$ точный критерий

Также была предпринята попытка сравнения полученных нами данных с результатами исследований, проводимых за рубежом – в частности, в рамках когортных исследований ESP Cohort Populations (National Center for Biotechnology Information, USA <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) – таблица 3.

Таблица 3 – Сравнение результатов генотипирования с данными ESP Cohort Populations

| Ген/ полиморфизм | Генотип/ аллель | ESP Cohort Populations (n*) | Пациенты с РМЖ | | Группа сравнения (n=123) | p | | |
|--|--------------------|-----------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|---------------|---------------|-------------|
| | | Выборка №1 | ¹ Выборка №2.1 (n=146) | ² Выборка №2.2 (n=155) | Выборка №3 | В. №1/В. №2.1 | В. №1/В. №2.2 | В. №1/В. №3 |
| <i>TP53</i> P72R (rs1042522) n*=3440 | CC | 18,0% | 7,5% | 7,1% | 7,3% | 0,001 | 0,001 | 0,021 |
| | CG | 43,6% | 42,5% | 41,9% | 49,6% | | | |
| | GG | 38,4% | 50,0% | 51,0% | 43,1% | | | |
| | аллель С | 39,8% | 28,8% | 28,1% | 32,1% | <0,001 | <0,001 | 0,02 |
| | аллель G | 60,2% | 71,2% | 71,9% | 67,9% | | | |
| <i>HMMR</i> V353A (rs299290) n*=4504 | TT | 53,3% | 47,9% | 49,0% | 44,7% | NS | NS | NS |
| | TC | 39,6% | 43,2% | 41,9% | 50,4% | | | |
| | CC | 7,1% | 8,9% | 9,0% | 4,9% | | | |
| | аллель T | 73,1% | 69,5% | 70,0% | 69,9% | NS | NS | NS |
| | аллель C | 26,9% | 30,5% | 30,0% | 30,1% | | | |

* – показаны статистически значимые различия [NS (not significant) – статистически значимых различий не выявлено], использовали критерии χ^2 , при $n < 5$ точный критерий

¹ – Группа «Монолатеральный РМЖ»

² – Группа «Все случаи РМЖ»

Таким образом, как в выборке пациентов с РМЖ (в не зависимости от локализации – би- или униполярный), так и во внутренней группе сравнения нами отмечен статистически значимо низкий процент генотипа С/С и аллели С по ОНП R72P (*TP53*) в сравнении с данными широкомасштабных когортных исследований ESP Cohort Populations. Отмечается тенденция увеличения распространенности гомозиготного носительства по генотипу G/G при сохранении на приблизительно одинаковом уровне частоты гетерозигот – рисунок 2. В недавно проведенном Hongtao Cheng et al. мета-анализе было доказано отсутствие влияния ОНП R72P гена *TP53* на риск развития РМЖ [10], что хорошо согласуется с работой Ma et al. [11], но противоречит результатам первого мета-анализа Zhang et al. по данной проблематике [12].

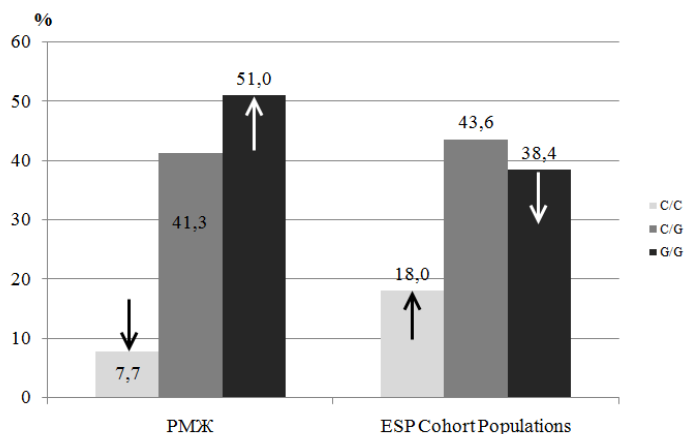


Рисунок 2 – Частота распространенности генотипов по ОНП R72P (*TP53*) в группах РМЖ и ESP Cohort Populations

Следует также отметить, что именно с наличием аллели G связан неблагоприятный исход при наличии РМЖ – в некоторых исследованиях было показано снижение значения 5-летней выживаемости и плохой ответ на химиотерапию [13–15].

Расчет отношения шансов (ОШ) не выявил статистически значимых различий – таблица 4.

Таблица 4 – Расчет отношения шансов (ОШ) для исследуемых полиморфизмов

| Генотип | Основная группа | Группа сравнения | χ^2 | p | ОШ | |
|------------------------------|-----------------|------------------|----------|------|-------|-----------|
| | n=155 | n=123 | | | знач. | 95% ДИ |
| <i>TP53</i> P72R (rs1042522) | | | | | | |
| C/C | 0,071 | 0,073 | 1,79 | 0,41 | 0,97 | 0,39–2,41 |
| C/G | 0,419 | 0,496 | | | 0,73 | 0,46–1,18 |
| G/G | 0,510 | 0,431 | | | 1,37 | 0,85–2,21 |
| <i>HMMR</i> V353A (rs299290) | | | | | | |
| T/T | 0,490 | 0,447 | 2,99 | 0,22 | 1,19 | 0,74–1,91 |
| T/C | 0,419 | 0,504 | | | 0,71 | 0,44–1,14 |
| C/C | 0,090 | 0,049 | | | 1,94 | 0,72–5,20 |

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют от отсутствии связи между ОНП R72P (*TP53*) и V353A (*HMMR*) и риском развития РМЖ у пациентов из Республики Беларусь и хорошо согласуются с результатами зарубежных исследований [10,16].

Также было проведено сравнение частот встречаемости генотипов по анализируемым ОНП с некоторыми клинико-морфологическими характеристиками основного опухолевого узла. Анализ проводился по таким параметрам, как: размер первичной опухоли (T), наличие метастазов в регионарных лимфоузлах (N), степень злокачественности опухоли (G), наличие отдаленных метастазов и/или рецидивов, статус рецепторов к эстрогенам (PЭ) и прогестерону (PП), а также по уровню экспрессии Her-2/neu – таблица 5.

Таблица 5 – Анализ различий клинико–морфологических характеристик опухоли в зависимости от генотипа

| Клинико–морфологическая характеристика опухоли | Полиморфизм | | | |
|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | TP53 P72R (rs1042522) | HMMR V353A (rs299290) | TP53 P72R (rs1042522) | HMMR V353A (rs299290) |
| Группа | «Все случаи РМЖ» | | «Монолатеральный РМЖ» | |
| T – первичная опухоль (T ₀ –T ₄) | NS | NS | NS | NS |
| N – метастатическое поражение регионарных лимфатических узлов (N ₀ – нет, N ₁₋₃ – есть) | NS | NS | NS | NS |
| G – степень злокачественности опухоли по Bloom–Richardson (G ₁ –G ₃) | NS | NS | NS | NS |
| Наличие отдаленных метастазов и/или рецидивов (наличие/отсутствие) | NS | NS | NS | NS |
| Статус РП (отрицательный/положительный) | NS | NS | NS | NS |
| Статус РЭ (отрицательный/положительный) | NS | 0,072 | NS | 0,014 |
| Her–2/neu (баллы 0–3+) | 0,012 | NS | 0,013 | NS |

* – показаны статистически значимые различия [NS (not significant) – статистически значимых различий не выявлено], использовали критерий χ^2 (в случае $p < 5$ – точный критерий)

Частотное распределение генотипов в зависимости от уровня экспрессии Her–2/neu и статуса РЭ представлены на рисунках 3 и 4 соответственно.

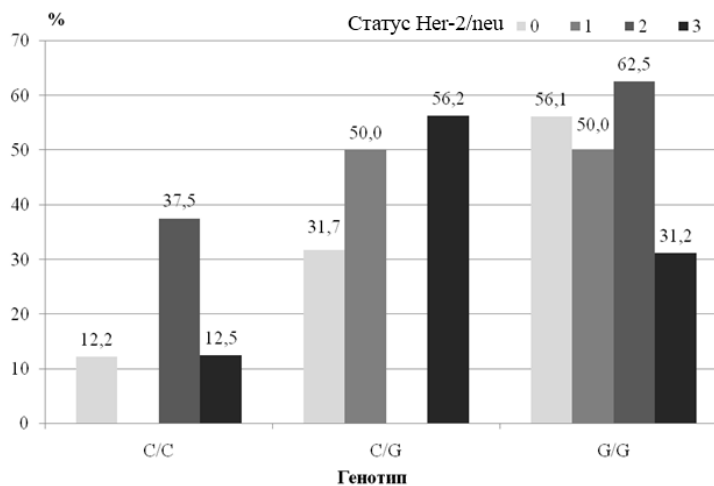


Рисунок 3 – Связь генотипа по полиморфизму P72R в гене TP53 с уровнем Her–2/neu (для группы «Все случаи РМЖ»)

Стоит отметить, что статистически значимыми являются различия, касающиеся уровня экспрессии Her–2/neu в 2 балла. Так, нами не выявлено ни одного случая гетерозиготного носительства, в то время как для генотипа C/C уровень экспрессии в 2 балла выявлен в 37,5% (3/8), для генотипа G/G – 62,5% (5/8). В то же время, нельзя исключать из внимания и тот факт, что общее количество пациентов с уровнем экспрессии Her–2/neu = 2 было равным 8. Использование точных критериев сравнения позволило выявить статистически значимые различия, однако делать заключения, основываясь на таком количестве случаев, приходится с определенной долей опаски. В то же время, при разделении всех данных по степени экспрессии Her–2/neu лишь на две группы: «Гиперэкспрессия Her–2/neu» и «Отсутствие гиперэкспрессии Her–2/neu», – статистически значимых различий уже не наблюдается. Предположительно, высоким уровнем информативности могут

обладать результаты совместного определения генотипа по ОНП R72P (*TP53*) и уровня экспрессии Her-2/neu. Об этом говорит и умеренное значение коэффициента Фи (мера связи двух переменных, аналог корреляции Пирсона для номинальных данных), равное для пары «Генотип R72P»/«Her-2/neu» 0,411 ($p=0,019$).

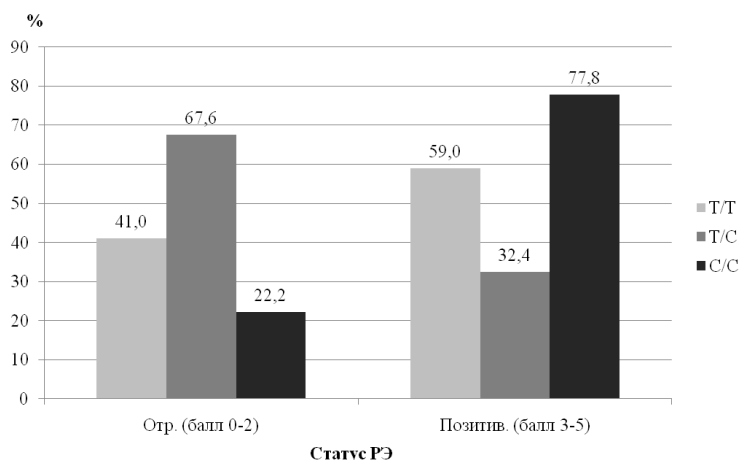


Рисунок 4 – Связь генотипа по полиморфизму V353R в гене HMMR со статусом РЭ (для группы «Монолатеральный РМЖ»)

Также для случаев монолатерального РМЖ установлено, что с уровнем значимости $p=0,014$ генотип T/C (полиморфизм V353A, *HMMR*) чаще ассоциирован с отрицательным статусом РЭ – 67,6% (25/37), в то время как в случаях с позитивным статусом РЭ частота его встречаемости в 2 раза ниже (32,4%, 12/37).

Заключение. Таким образом, по результатам данного исследования можно сделать следующие выводы:

- 1) не выявлено статистически значимых различий по частоте встречаемости генотипов по ОНП R72P (*TP53*) и V353A (*HMMR*) между группой пациентов с РМЖ и группой сравнения;
- 2) не обнаружено связи между частотой распространенности генотипов по данным ОНП и риском развития РМЖ;
- 3) генотип C/C (R72P, *TP53*) в выборке пациентов с РМЖ статистически значимо ($p<0,01$) встречается реже по сравнению с данными когортных исследований ESP Cohort Populations;
- 4) установлены статистически значимые различия ($p<0,05$) между частотой распространенности генотипа C/G (R72P, *TP53*) и уровнем экспрессии Her-2/neu в группе пациентов с РМЖ;
- 5) генотип C/T (V353A, *HMMR*) ассоциирован с РЭ–отрицательными опухолями молочной железы ($p<0,05$).

Дальнейший статистический анализ, включающий возрастные данные верификации диагноза РМЖ, а также информация относительно гистологического типа и молекулярных подтипов опухолей позволит более полно оценить вклад данных ОНП в прогрессию РМЖ среди пациентов из Республики Беларусь.

ЛИТЕРАТУРА

1. Pujana MA, Han JD, Starita LM Network modeling links breast cancer susceptibility and centrosome dysfunction Nat Genet. 2007 Nov;39(11):1338–49. Epub 2007 Oct 7.
2. Haering, C. H., Farcas, A.–M., Arumugam, P., Metson, J., Nasmyth, K. The cohesin ring concatenates sister DNA molecules. Nature 454: 297–301, 2008. [PubMed: 18596691, related citations] [Full Text: Nature Publishing Group]
3. Tsukasaki, K., Miller, C. W., Greenspun, E., Eshaghian, S., Kawabata, H., Fujimoto, T., Tomonaga, M., Sawyers, C., Said, J. W., Koeffler, H. P. Mutations in the mitotic check point gene, MAD1L1, in human cancers. Oncogene 20: 3301–3305, 2001. [PubMed: 11423979, related citations] [Full Text: Nature Publishing Group]
4. Kalmyrzaev B, Pharoah PD, Easton DF Hyaluronan–mediated motility receptor gene single nucleotide polymorphisms and risk of breast cancer Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2008 Dec;17(12):3618–20. doi: 10.1158/1055–9965.EPI–08–0216.
5. Breast Cancer Association Consortium Commonly studied single–nucleotide polymorphisms and breast cancer: results from the Breast Cancer Association Consortium J Natl Cancer Inst. 2006 Oct 4;98(19):1382–96. Erratum in: J Natl Cancer Inst. 2007 May 7;99(5):411.

6. Aittomäki K, Heikkilä P, Blomqvist C Breast cancer patients with p53 Pro72 homozygous genotype have a poorer survival Clin Cancer Res. 2005 Jul 15;11(14):5098–103.
7. Toyama T, Zhang Z, Nishio M Association of TP53 codon 72 polymorphism and the outcome of adjuvant therapy in breast cancer patients Breast Cancer Res. 2007;9(3):R34.
8. Kheirleisid, E.A. Bilateral breast cancer: analysis of incidence, outcome, survival and disease characteristics / E.A. Kheirleisid, H. Jumustafa, N. Miller et al. // Breast Cancer Res Treat. – 2011 – 126(1):131–40;
9. Helene, C. Johanson DNA elution from buccal cells stored on Whatman FTA Classic Cards using a modified methanol fixation method / H.C. Johanson, H. Valentine, W. Carol et al. // Sturm BioTechniques – 2009 – 46:309–311;
10. Cheng H, Ma B, Jiang R, Wang W Individual and combined effects of MDM2 SNP309 and TP53 Arg72Pro on breast cancer risk: an updated meta-analysis Mol Biol Rep. 2012 Sep;39(9):9265–74
11. Ma Y, Yang J, Liu Z, Zhang P, Yang Z et al (2011) No significant association between the TP53 codon 72 polymorphism and breast cancer risk: a meta-analysis of 21 studies involving 24,063 subjects. Breast Cancer Res Treat 125:201–205
12. Zhang Z, Wang M, Wu D, Tong N, Tian Y (2010) P53 codon 72 polymorphism contributes to breast cancer risk: a meta-analysis based on 39 case-control studies. Breast Cancer Res Treat 120:509–517
13. Al-Qasem A, Toulimat M, Tulbah A The p53 codon 72 polymorphism is associated with risk and early onset of breast cancer among Saudi women Oncol Lett. 2012 Apr 1;3(4):875–878
14. van den Broek AJ, Broeks A, Horlings HM Association of the germline TP53 R72P and MDM2 SNP309 variants with breast cancer survival in specific breast tumor subgroups Breast Cancer Res Treat. 2011 Nov;130(2):599–608
15. Tommiska J, Eerola H, Heinonen M Breast cancer patients with p53 Pro72 homozygous genotype have a poorer survival Clin Cancer Res. 2005 Jul 15;11(14):5098–103
16. Kalmyrzaev B, Pharoah PD, Easton DF Hyaluronan-mediated motility receptor gene single nucleotide polymorphisms and risk of breast cancer Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2008 Dec;17(12):3618–20
17. Pujana MA, Han JD, Starita LM, Stevens KN Network modeling links breast cancer susceptibility and centrosome dysfunction Nat Genet. 2007 Nov;39(11):1338–49