

Ассоциация генов *TP53* и *MDM2* с риском развития рака молочной железы у русских женщин Московского региона

Бурденный А.М.¹, Казубская Т.П.², Брага Э.А.³, Носиков В.В.^{1,3}, Логинов В.И.³

¹ — ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН», Москва; e-mail: burdennyu@gmail.com; nosikov@sky.chph.ras.ru

² — ФГБУ Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва, Каширское ш., д.23

³ — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Медико-генетический научный центр» Российской академии медицинских наук, Москва, 115478, ул. Москворечье, д. 1; e-mail: ebraga@mail.ru; loginov7@genetika.ru

Исследована ассоциация полиморфных маркёров *Arg72Pro* гена *TP53* и *T309G* гена *MDM2* с риском развития рака молочной железы (РМЖ) у женщин московского региона. Показана ассоциация генотипа *Arg/Pro* полиморфного маркёра *Arg72Pro* гена *TP53* как с развитием РМЖ (OR=2,15, CI95%=1,24–3,73), так и с цистогистологическим подтипом инфильтративно-протоковым РМЖ. В случае сочетанного генотипа *Pro/Pro* + *T/G* генов *TP53* и *MDM2* обнаружена высокодостоверная ассоциация с риском развития РМЖ и его наиболее часто встречающейся формой — инфильтративно-протоковым раком.

Ключевые слова: полиморфные маркёры, ген *TP53*, ген *MDM2*, рак молочной железы (РМЖ), инфильтративно-протоковый рак молочной железы (ипРМЖ), инфильтративно-дольковый рак молочной железы (идРМЖ)

Введение

РМЖ занимает лидирующие позиции по заболеваемости злокачественными новообразованиями среди женщин, у каждой 12-й имеется риск заболеть РМЖ в течение жизни, смертность при этом составляет до 40% [7]. Генетическая предрасположенность, обусловленная наследственно передающимися нарушениями в ряде генов, например в генах *BRCA1* и *BRCA2*, проявляется лишь в 5–8% случаев развития РМЖ [4]. Изучению этиологии, генетических факторов, молекулярных механизмов и поиска оптимального лечения sporadического РМЖ посвящено большое количество работ [6, 8, 17, 19, 21], однако до сих пор проблема остаётся до конца не решённой [3]. Злокачественное изменение клеток и прогрессия опухолевого роста, клинически проявляющаяся инвазией, регионарным и отдалённым метастазированием, связаны с нарушениями нормального функционирования генома [1, 9, 14]. Молекулярный патогенез РМЖ, как и многих онкологических заболеваний, включает множество генетических и эпигенетических событий, ведущих к активации онкогенов и инактивации генов опухолевой супрессии, лежащих в основе опухолевой трансформации [5]. Одним из таких генов является ген *TP53*, кодирующий белок p53, вовлечённый в регуляцию механизмов распознавания и проведения сигналов внутри клетки, репарацию генома, регуляцию клеточного деления и клеточной смерти, координацию метаболических процессов, регуляцию взаимодействий между клетками [2]. Контролирующая функция p53 заключается в предотвращении отклонений и связанных с ними патологий, а недостаточность этого белка ведёт к неизбежному развитию серьёзных заболеваний, в том числе и РМЖ.

В гене *TP53* обнаружено более 30 полиморфных маркёров, из которых наиболее функционально значимым является однонуклеотидный полиморфизм в кодоне 72 эк-

зона 4 (*Arg72Pro*). Это связано с тем, что аминокислотный остаток в положении 72 входит в состав домена, связывающегося с ДНК. В ряде работ было показано, что варианты с остатками Arg и Pro в положении 72 обладают разной способностью индуцировать апоптоз и защищать от опухолевого перерождения клеток. Так, вариант белка Arg72, соответствующий эволюционно более молодому аллелю, более эффективен в индукции апоптоза, активнее транспортируется в митохондрии, способствует раскрытию митохондриальных пор и лучше защищает клетки от опухолевого перерождения [10, 24]. В то же время носители аллеля Pro72 живут дольше после манифестации заболевания и отличаются большей устойчивостью к стрессам и пониженной скоростью старения [15, 20]. Совсем недавно было также установлено, что ген *TP53* участвует в альтернативном механизме регуляции генов опухолевой супрессии, среди которых важную роль играет ген *RASSF1A* [22].

Также особый интерес представляет ген *MDM2*, кодирующий ядерный белок Mdm2 (murine double minute-2 protein), который, связываясь с p53, способствует его деградации [2]. Полиморфный маркёр *T309G* гена *MDM2* расположен в промоторной области, и наличие остатка G в положении 309 обуславливает более высокое сродство к фактору транскрипции SP1. Поэтому носители аллеля G имеют более высокий уровень экспрессии гена *MDM2*, что, в свою очередь, приводит к более быстрой деградации белка p53 [11]. Также показано, что генотип *TG* ассоциирован с более ранней манифестацией онкологического процесса [25, 26], и пониженной выживаемостью при РМЖ [13].

Целью настоящей работы было исследование распределения частот генотипов полиморфных маркёров *Arg72Pro* гена *TP53* и *T309G* гена *MDM2* и их комбинаций у больных с различными гистологическими типами РМЖ у женщин Московского региона и онкологически здоровых.

Материалы и методы

Исследование проводилось с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности. Получено разрешение этического комитета НИИ КО РОНЦ им. Н.Н. Блохина, РАМН (Москва). В исследование вошли 140 больных РМЖ, в возрасте 53 ± 17 лет, не получавших до забора крови лучевую или химиотерапию. В качестве контроля использовали сопоставимую по возрасту выборку онкологически здоровых лиц ($n=100$) Московского региона. Диагноз и гистологическая форма РМЖ устанавливались на основании гистологического исследования в НИИ КО РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Выборка больных представлена 35 больными с инфильтративно-дольковым (идРМЖ) и 105 больными с инфильтративно-протоковым РМЖ (ипРМЖ). Материалом для исследования служила геномная ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической крови с помощью протеиназы К с последующей фенольно-хлороформной экстракцией и осаждением этанолом. Идентификация аллелей полиморфных маркёров генов проводилась путём анализа ПЦР-ПДРФ. Нуклеотидные последовательности праймеров приведены в табл. 1. ПЦР проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 60 мМ Трис-НCl, pH 8,9, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 25 мМ KCl, 0,1%-ный Тритон X-100; 0,25 мМ каждого dNTP; 1–10 нг ДНК; 25 пМ каждого праймера; 0,5 ед. Taq-полимеразы («СибЭнзим»); MgCl₂ в концентрации 2,0 мМ. Амплификацию проводили по следующей программе: 94°C, 1 мин 30 с; 35 циклов 92°C, 15 с; 60°C, 20 с; 72°C, 15 с; 72°C, 1 мин 30 с, на амплификаторе Терцик (Россия).

Далее амплифицированный фрагмент ДНК гена *MDM2* подвергали обработке рестриктазой *MspA1I* («СибЭнзим») в термостате при 37°C в течение 16 ч, амплифицированный фрагмент ДНК гена *TP53* подвергали обработке рестриктазой *BstH1I* («СибЭнзим») в термостате при 65°C в течение 16 ч.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета прикладных программ Statistica for Windows 6.0. При сравнении частот генотипов использовался стандартный критерий χ^2 Пирсона. Для всех изученных полиморфных вариантов генов в выборках пациентов распределение генотипов соответствовало ожидаемому при равновесии Харди—Вайнберга. Комплексную оценку взаимосвязей между исследуемыми генами проводили с использованием логистической регрессии, определяя отношение шансов (OR) с 95%-ным доверительным интервалом (CI) при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Распределение частот генотипов полиморфных маркёров *Arg72Pro* гена *TP53* и *T309G* гена *MDM2* в контрольной группе и группе больных РМЖ представлено в табл. 2. Показана ассоциация генотипа *Pro/Pro* гена *TP53* с РМЖ. Так, частота данного генотипа в группе больных оказалась в 1,2 раза выше по сравнению с группой контроля, в то же время частота генотипа *Arg/Arg* снижена в 3,4 раза ($\chi^2=22,95$). Установлено, что частота предрасполагающего генотипа *TG* гена *MDM2* в группе больных с РМЖ не отличалась от таковой в контрольной группе. Полученные нами данные согласуются с данными, полученными в других исследованиях [18].

При изучении распределения частот генотипов полиморфного маркёра *Arg72Pro* гена *TP53* при идРМЖ и ипРМЖ получены достоверные различия частот генотипов *Arg/Pro* и *Pro/Pro* гена *TP53* и в группе больных и в контроле (табл. 2). Полученные нами данные согласуются с данными других авторов [18, 23].

При изучении частот распределения генотипов полиморфных маркёров *Arg72Pro* гена *TP53* и *T309G* гена *MDM2* у больных РМЖ с различными патогенетическими характеристиками злокачественного процесса, такими, как лимфогенное и гематогенное метастазирование, стадия, размер и степень дифференцировки опухоли, ассоциации не найдены.

При изучении влияния возрастного фактора нами были установлены значимые различия в распределении частот генотипов полиморфных маркёров *Arg72Pro* гена *TP53* и *T309G* гена *MDM2* у больных РМЖ. Так, частота генотипа *Pro/Pro* гена *TP53* в группе больных РМЖ младшего и среднего возраста (моложе 53 лет) составила 47% ($\chi^2=24,47$, $p=5 \cdot 10^{-6}$; OR=2,09, CI 95%=1,01–4,36), статистически значимо превышая этот показатель в контроле (29%). Таким образом, полиморфный маркёр *Arg72Pro* гена *TP53* ассоциирован с развитием РМЖ. Следует отметить, что частота распределения генотипа *TG* гена *MDM2* в той же возрастной группе больных не превышала таковую в группе контроля. Наши результаты согласуются с данными ряда зарубежных авторов [12, 16].

Значительный интерес представляют также результаты, полученные при изучении распределения частот сочетанных генотипов изученных полиморфных маркёров. Так, частота генотипа *Pro/Pro* + *TG* генов *TP53* и *MDM2* в группе больных РМЖ составила 12,9% (OR=9,19, CI 95%=1,11–75,81, $p=0,05$), статистически значимо

Последовательность праймеров
для проведения амплификации полиморфных маркёров генов *TP53* и *MDM2*

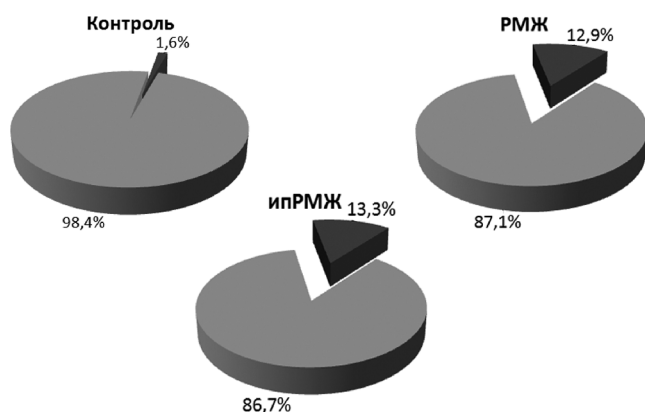
Таблица 1

Маркёр	Последовательность праймеров
<i>Arg72Pro</i> rs2279744	F: CGCGGGAGTTTCAGGGTAAAG
	R: GCAGTTTCGGAACGTGTCTG
<i>T309G</i> rs1042522	F: AGGAGCTGCTGGTGCAGGGGCCGCG
	R: TAAGGACAAGGGTTGGGCTGGGGACCTGGA

Распределение частот генотипов полиморфных маркёров *Arg72Pro* гена *TP53* и *T309G* гена *MDM2* среди больных раком молочной железы, его гистологических типов и здоровых индивидов

Рак молочной железы							
Ген	Генотип	PMЖ, n=140	Контроль, n=100	χ^2	p	OR	
						Знач.	CI _{95%}
MDM2	T/T	0,943	0,970	0,98	0,61	0,51	0,13—1,97
	T/G	0,057	0,030			1,96	0,51—7,58
TP53	Arg/Arg	0,114	0,370	22,95	1,0E-5	0,22	0,11—0,43
	Arg/Pro	0,443	0,270			2,15	1,24—3,74
	Pro/Pro	0,443	0,360			1,41	0,83—2,39
Инфильтративно-дольковый рак молочной железы							
Ген	Генотип	PMЖ, n=35	Контроль, n=100	χ^2	p	OR	
						Знач.	CI _{95%}
MDM2	T/T	0,943	0,970	0,54	0,77	0,51	0,08—3,19
	T/G	0,057	0,030			1,96	0,31—12,24
TP53	Arg/Arg	0,086	0,370	10,21	0,006	0,16	0,05—0,56
	Arg/Pro	0,429	0,270			2,03	0,91—4,52
	Pro/Pro	0,486	0,360			1,68	0,77—3,66
Инфильтративно-протоковый рак молочной железы							
Ген	Генотип	PMЖ, n=105	Контроль, n=100	χ^2	p	OR	
						Знач.	CI _{95%}
MDM2	T/T	0,924	0,970	2,15	0,34	0,38	0,10—1,46
	T/G	0,076	0,030			2,67	0,69—10,35
TP53	Arg/Arg	0,124	0,370	17,81	0,0001	0,24	0,12—0,49
	Arg/Pro	0,448	0,270			2,19	1,22—3,93
	Pro/Pro	0,429	0,360			1,33	0,76—2,34

превышая этот показатель в контрольной группе (1,6%). Следует также отметить, что при рассмотрении сочетания генотипов изученных полиморфных маркёров генов *TP53* и *MDM2* в гистологических подтипах РМЖ, было отмечено увеличение частоты встречаемости генотипа *Pro/Pro* + *TG* в группе больных ипРМЖ в 8 раз (OR=9,54, CI 95%=1,11–82,26, p=0,05) (рисунок).



■ *TP53(Pro/Pro)/MDM2(T/G)* ■ *TP53(Arg/Arg + Arg/Pro)/MDM2(T/T)*
Распределение частот сочетанных генотипов генов *TP53* и *MDM2* в контрольной группе и в группе больных РМЖ и ипРМЖ

Заключение

В настоящей работе изучено распределение частот генотипов полиморфных маркёров *Arg72Pro* гена *TP53* и *T309G* гена *MDM2* при РМЖ. Обнаружена повышенная частота генотипов *Arg/Pro* и *Pro/Pro* гена *TP53* у больных РМЖ и его гистологическими подтипами (идРМЖ и ипРМЖ), что может свидетельствовать о том, что носительство predisposing аллеля *Pro* генов *TP53* играет важную роль в формировании РМЖ.

Также для генотипа *Pro/Pro* полиморфного маркёра гена *TP53* показана ассоциация с развитием РМЖ у пациентов в возрасте моложе 53 лет.

В нашей работе для сочетанного генотипа *Pro/Pro* + *TG* генов *TP53* и *MDM2* была показана достоверная ассоциация с риском развития РМЖ и его гистологического подтипа — ипРМЖ у женщин Московского региона.

Выявленные особенности могли бы быть использованы при разработке современных методов прогнозирования, профилактики и лечения РМЖ, а также для формирования групп риска пациентов Московского региона.

Список литературы

1. Блохин Д.Ю. «Постгеномный взгляд» на проблемы онкогенеза // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. — 2009. — Т. 2, №3. — С. 277—282.
2. Желтухин А.О., Чумаков П.М. Повседневные и индуцируемые функции гена p53 // Успехи биоорганической химии. — 2010. — Т. 50. — С. 447—516.
3. Жуков Н.В., Тюляндин С.А., Болотина Л.В., Бяхов М.Ю., Злокачественные опухоли // Journal of malignant tumours. — 2012. — Vol. 2, №2. — P. 168.
4. Имянитов Е.Н. Наследственный рак молочной железы // Практическая онкология. — 2010. — Т. 11, №4. — С. 258—266.
5. Кулигина Е.Ш. Эпидемиологические и молекулярные аспекты рака молочной железы // Практическая онкология. — 2010. — Т. 11, №4. — P. 203—216.
6. Силков А.Н., Горева Е.П., Жовмер А.С., Киреев Ф.Д., Максимов В.Н., Пилипенко И.В., Малиновская Е.А., Бабышкина Н.Н., Литвяков Н.В., Сеников С.В., Козлов В.А. Полиморфизм генов ИЛ-18 и ИЛ-1 β у больных раком молочной железы // Российский журнал иммунологии. — 2009. — Т. 3, №12. — С. 259—266.
7. Чиссова В.И., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2010 году (заболеваемость и смертность). — М.: ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздрава России, 2012. — 260 с.
8. Alvarez R.H., Valero V., Hortobagyi G.N. Emerging Targeted Therapies for Breast Cancer // Journal of clinical oncology. — 2010. — Vol. 28, №20. — P. 3366—3379.
9. Ayoub N., Lucas C., Kaddoumi A. Genomics and pharmacogenomics of breast cancer: current knowledge and trends // Asian Pac. J. Cancer Prev. — 2011. — Vol. 12, №5. — P. 1127—1140.
10. Bonafe M., Salvioli S., Barbi C., Trapassi C., Tocco F., Storci G., Invidia L., Vannini I., Rossi M., Marzi E., Mishto M., Capri M., Olivieri F., Antonicelli R., Memo M., Uberti D., Nacmias B., Sorbi S., Monti D., Franceschi C. The different apoptotic potential of the p53 codon 72 alleles increases with age and modulates in vivo ischaemia-induced cell death // Cell Death Differ. — 2004. — Vol. 11, №9. — P. 962—973.
11. Bond G.L., Hirshfield K.M., Kirchhoff T., Alexe G., Bond E.E., Robins H., Bartel F., Taubert H., Wuerl P., Hait W., Toppmeyer D., Offit K., Levine A.J. MDM2 *T309G* accelerates tumor formation in a gender-specific and hormone-dependent manner // Cancer Res. — 2006. — Vol. 66, №10. — P. 5104—5110.
12. Faghani M., Ghasemi F.M., Nikhbakht M., Salehi M. TP53 PIN3 polymorphism associated with breast cancer risk in Iranian women // Indian J. Cancer. — 2011. — Vol. 48, №3. — P. 298—302.
13. Leeuwen F.E., Van't Veer L.J., Pharoah P.D.P., Easton D.F., Shah M., Humphreys M., Doerk T., Reincke S.A., Fagerholm R., Blomqvist C., Nevanlinna H. Combined effects of single nucleotide polymorphisms TP53 R72P and MDM2 *T309G*, and p53 expression on survival of breast cancer patients // Breast Cancer Res. — 2009. — Vol. 11, №6. — R89.
14. Meindl A., Ditsch N., Kast K., Rhiem K., Schmutzler R.K. Hereditary breast and ovarian cancer: new genes, new treatments, new concepts // Dtsch. Arztebl. Int. — 2011. — Vol. 108 №19. — P. 323—330.
15. Orsted D.D., Bojesen S.E., Tybjaerg-Hansen A., Nordestgaard B.G. Tumor suppressor p53 Arg72Pro polymorphism and longevity, cancer survival, and risk of cancer in the general population // J. Exp. Med. — 2007. — Vol. 204, №6. — P. 1295—1301.
16. Petenkaya A., Bozkurt B., Akilli-Ozturk O., Kaya H.S., Gur-Dedeoglu B., Yulug I.G. Lack of association between the MDM2-*T309G* polymorphism and breast cancer risk // Anticancer Res. — 2006. — Vol. 26, №6C. — P. 4975—4977.
17. Peterson C. Drug therapy of cancer // Eur. J. Clin. Pharmacol. — 2011. — Vol. 67, №5. — P. 437—447.
18. Proestling K., Hebar A., Pruckner N., Marton E., Vinatzer U., Schreiber M. The Pro Allele of the p53 Codon 72 Polymorphism Is Associated with Decreased Intratumoral Expression of BAX and p21, and Increased Breast Cancer Risk // PLoS One. — 2012. — Vol. 7, №10. — e47325.
19. Reinholz M.M., Bruzek A.K., Visscher D.W., Lingle W.L., Schroeder M.J., Perez E.A., Jenkins R.B. Breast cancer and aneuploidy 17: implications for carcinogenesis and therapeutic response // Lancet Oncol. — 2009. — Vol. 10, №3. — P. 267—277.
20. Rodier F., Campisi J., Bhaumik D. Two faces of p53: aging and tumor suppression // Nucleic Acids Res. — 2007. — Vol. 35, №22. — P. 7475—7484.
21. Tenhagen M., van Diest P.J., Ivanova I.A., van der Wall E., van der Groep P. Fibroblast growth factor receptors in breast cancer: expression, downstream effects, and possible drug targets // Endocr. Relat. Cancer. — 2012. — Vol. 19, №4. — P. 115—129.
22. Tian Y., Hou Y., Zhou X., Cheng H., Zhou R. Tumor Suppressor RASSF1A Promoter: p53 Binding and Methylation // PLoS ONE — 2011. — Vol. 6, №2. — e17017.
23. Tommiska J., Eerola H., Heinonen M., Salonen L., Kaare M., Tallila J., Ristimäki A., von Smitten K., Aittomäki K., Heikila P., Blomqvist C., Nevanlinna H. MDM2 *T309G* accelerates breast and ovarian carcinogenesis in BRCA1 and BRCA2 carriers of Jewish-Ashkenazi descent // Clin. Cancer Res. — 2005. — Vol. 11, №14. — P. 5098—5103.
24. van Heemst D., Mooijaart S.P., Beekman M., Schreuder J., de Craen A.J., Brandt B.W., Slagboom P.E., Westendorp R.G. Variation in the human TP53 gene affects old age survival and cancer mortality // Exp. Gerontol. — 2005. — Vol. 40, №1—2. — P. 11—15.
25. Whibley C., Pharoah P.D., Hollstein M. p53 polymorphisms: cancer implications // Nat. Rev. Cancer. — 2009. — Vol. 9, №2. — P. 95—107.
26. Yarden R.I., Friedman E., Metsuyanin S., Olender T., Ben-Ascher E., Papa M.Z. MDM2 *T309G* accelerates breast and ovarian carcinogenesis in BRCA1 and BRCA2 carriers of Jewish-Ashkenazi descent // Breast Cancer Res. Treat. — 2008. — Vol. 111, №3. — P. 497—504.

Association of polymorphic markers of *TP53* and *MDM2* genes with breast cancer in females of Moscow region

Burdenny A.M.¹, Kazubskaya T.P.², Braga E.A.³, Nosikov V.V.^{1,3}, Loginov V.I.³

¹ — Emanuel Institute of Biochemical Physics of Russian Academy of Sciences, Russia, Moscow; e-mail: burdenny@gmail.com

² — Blokhin Russian Oncological Research Center of Russian Academy of Medical Sciences, Russia, Moscow

³ — National Research Center of Russian Federation «GosNI genetika»; e-mail: loginov7@genetika.ru

An association of polymorphic markers *Arg72Pro* of *TP53* gene and *T309G* of *MDM2* gene with risk of breast cancer in females of Moscow region has been studied. We found an association of *Pro/Pro* genotype of polymorphic marker *Arg72Pro* with breast cancer development (OR=1.41, $p=10^{-5}$) and with ductal and lobular breast cancer development (OR=1.33, $p=0.0001$, OR=1.68, $p=0.006$, respectively). In case of combined susceptible genotype *Pro/Pro* + *TG* of *TP53* and *MDM2* genes we have found highly reliable association with breast cancer and its most frequent subtype — ductal breast carcinoma ($p=0.05$; $p=0.05$, respectively).

Key words: polymorphic marker, *TP53* and *MDM2* genes, breast cancer (BC), ductal breast carcinoma (DBC), lobular breast carcinoma (LBC)