

УДК 618.19-006.6:[616.153.96:575.224.4

Т.В. Крук¹,О.П. Пересунько,¹Р.А. Волков²

Буковинський державний медичний
університет, м. Чернівці¹,
Чернівецький національний університет
ім. Федьковича²

МУТАЦІЇ БІЛКА p53 В КРОВІ У ХВОРИХ НА РАК МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ ТА ЇХ НАЙБЛИЖЧИХ РОДИЧОК

Ключові слова: білок p53, рак
молочної залози, родичі, ризик
захворювання.

Резюме. У роботі проведено аналіз розподілу алельних варіантів та гепатинів гену-супресора p53 у крові хворих на рак молочної залози та їх родичок I ступеня спорідненості, який показав наявність мутантних варіантів цього гену у 5 (5%) хворих, 4 (8%) родичів та 4 (8%) пацієнток контрольної групи, що показує актуальність цього дослідження для оцінки ризику виникнення раку та прогнозу захворювання.

Вступ

Значну цінність для діагностики раку молочної залози (РМЗ) дає вивчення механізмів виникнення прогресії цієї патології. Сучасні уявлення щодо механізмів розвитку злоякісних пухлин взагалі ґрунтуються на досягненнях у галузі молекулярної біології та генетики, згідно з якими злоякісна трансформація розглядається як складний та багатоетапний процес накопичення в клітинах мутацій і змін у функціонуванні геному [1, 9, 11].

Відкриття генів-супресорів BRCA1 та BRCA2 та їх причетність до виникнення РМЗ - став одним із визначних етапів у вивченні раку цієї локалізації [3,4,12]. Також останні десятиріччя увагу вчених-генетиків привертає вивчення ще одного гену-супресора - білка p53, одного із основних регуляторів клітинного циклу [2, 7, 19]. Мутації гену p53 виявляються в клітинах білка 50% ракових пухлин [10,13,14]. Цей білок ще часто називають "сторожем геному" [15, 17,18,20]. При відсутності пошкодження генетичного апарату білок p53 знаходиться в неактивному стані, а при появі пошкодження ДНК - активується. Таким чином, p53 фактор, який запускає транскрипцію групи генів і який активується при накопиченні пошкодження ДНК, результатом якої є зупинка клітинного циклу і регулює ДНК, а при сильному стресовому сигналі - запуск апоптозу [5, 6, 8, 16].

Мета дослідження

Вивчити в крові хворих на рак молочної залози та їх родичів I ступеня спорідненості мутації гену p53.

Матеріали та методи

Генотипування мутацій, в гені p53 проведені в
© Т.В. Крук, О.П. Пересунько, Р.А. Волков, 2014

крові 101 хворої на РМЗ, 50 родичів I ступеня спорідненості, 50 пацієнтів - практично здорові (контрольна група).

Загальну геномну ДНК виділяли з крові згідно стандартного протоколу з використанням протеїнази К та додецилсульфату натрію як детергента [6].

Для генотипування проводили ампліфікацію відповідного фрагменту ДНК методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням розроблених нами пар праймерів RV1001+RV1002, RV1003 + RV1004 для гену BRCA1, RV1103+ RV1104 для гену GST T1, RV1301+RV1302 для гену GST P1, RV1303+ RV1304 для гену p53. Кількість ДНК для проведення ПЛР становила 50 нг на реакцію. Ампліфікацію ДНК проводили в середовищі такого складу: 1 x буфер для ПЛР (PCR-buffer, Qiagen, США), MgCl₂ - 2 мМ, суміш dNTP - 0.4 мМ кожного, праймери - 1 мМ кожного, ДНК-полімераза (HotStartTaq, Qiagen) - 3 од. активності на реакцію. Загальний об'єм реакційної суміші складав 50 мкл. ПЛР проводили з використанням ампліфікатора PTC-100 (MJ Research Inc, США) за такою програмою: (1) початкова активація ДНК-полімерази - 95°C, 2 хв.; (2) денатурація ДНК - 94°C, 45 с; (3) гібридизація праймерів - 54°C для праймерів RV1001+RV1002 та RV1003 + RV1004; 58 °C для всіх інших праймерів, 40 с; (4) синтез ДНК - 72°C, 1 хв.; (5) закінчення ампліфікації - 72°C, 8 хв.; (6) припинення реакції - 4°C. Загальна кількість циклів ампліфікації - 35. Аналіз результатів ПЛР проводили методом електрофорезу у 2% агарозному гелі (Маниатис и др., 1984). Для візуалізації ДНК гель забарвлювали етидієм бромідом та фотографували в ультрафіолетовому світлі на установці GelDoc 2000 (BioRad, США).

Для визначення довжини отриманих фрагментів їх електрофоретичну рухливість порівнювали з рухливістю ДНК-маркера Gene Ruler DNA Leader Mix (Fermentas, Литва).

Для виявлення поліморфізму в гені p53 отримані продукти ПЛР обробляли рестриктазами. Для гену p53 - рестриктазу Bsh 1236I. Реакцію проводили згідно з рекомендаціями виробника ферментів (Fermentas, Литва). Отримані рестриктні фрагменти аналізували методом електрофорезу в 10% поліакриламідному гелі у випадку коротких фрагментів або 2% агарозному гелі в інших випадках (Маниатис и др., 1984). Очікувані довжини фрагментів ДНК та розташування сайтів пізнання застосованих рестриктаз проводили за допомогою пакету програм комп'ютерної обробки даних DNASTAR із

використанням послідовності відповідних генів, яка наявна в базі даних Genbank.

Обговорення результатів дослідження

Результати дослідження алейних варіантів гену p53 приведені в таблиці 1. Патологічний мутантний гомозиготний ген "PP" був зафіксований у 5 хворих на рак молочної залози (5%), в чотирьох родичів (8%) та в чотирьох пацієнток контрольної групи (8%).

При порівнянні отриманих даних із частотами розподілу "мінорних" аелей контрольної групи встановлено переважання носіїв гомозигот норми (68%; табл. 1), у той же час відмічається значне зменшення частоти виявлення носіїв мутантної гомозиготи (4,8%; табл. 2).

Для хворих на РМЗ, також найбільш частою

Таблиця 1

Результати досліджень гену p53 у хворих на рак молочної залози, родичів та контрольної групи

Ген p53			
Хворі на рак молочної залози (n=101)	«RR» 66	Гомозигота норма	65,3%
	«PP» 5	Гомозигота мутант	5%
	«RP» 30	Гетерозигота	29,7%
Родичі (n=50)	«RR» 35	Гомозигота норма	70%
	«PP» 4	Гомозигота мутант	8%
	«RP» 11	Гетерозигота	22%
Контрольна група (n=50)	«RR» 34	Гомозигота норма	68%
	«PP» 4	Гомозигота мутант	8%
	«RP» 12	Гетерозигота	24%
Контрольна група+родичі (n=100)	«RR» 69	Гомозигота норма	69%
	«PP» 8	Гомозигота мутант	8%
	«RP» 23	Гетерозигота	23%

Таблиця 2

Розподіл алейних варіантів гену p53

Гаплотипи	Хворі на РМЗ n=101 (%)	Контрольна група, n=50 (%)	Всього n=151 (%)
RR (гомозиготна, норма)	66 (65,3%)	34 (68%)	101 (67,5%)
PP (гомозиготна, мутант)	5 (5%)	4 (8%)	9 (5%)
RP (гетерозигота)	30 (29,7%)	12 (24%)	42 (32,7%)

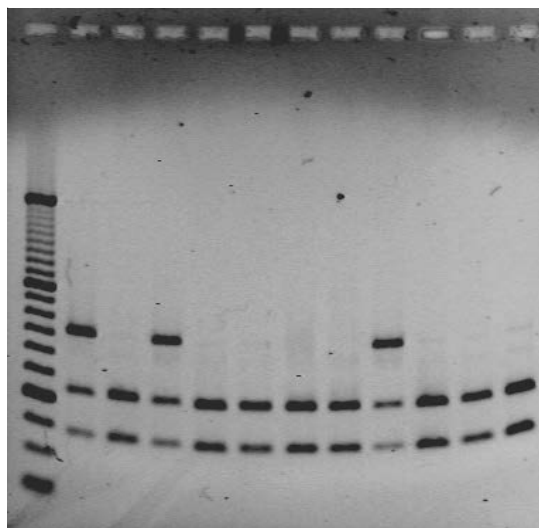
комбінацією генотипів було поєднання гетерозигот та гомозигот норми (95%). Мутантна РР гомозигота була виявлена в 5% випадків (табл. 1).

При аналізі комбінації генотипів у контрольній групі звертає на себе увагу домінування гомозигот за "RR" поліморфізмом гену p53 (68%; табл. 2).

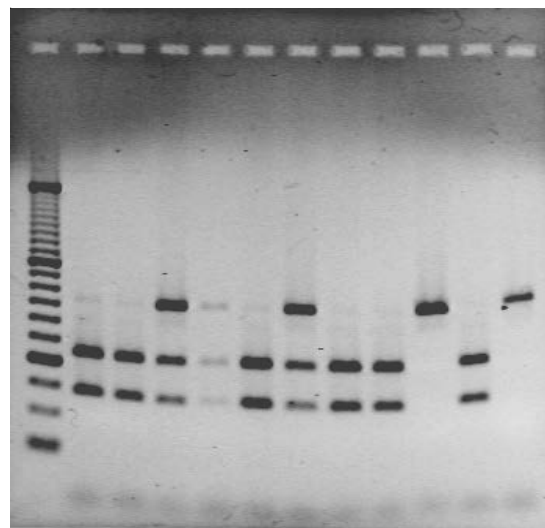
Патологічний "мутантний" РР - варіант був зафіксований в чотирьох випадках (8%). При

порівнянні серед груп спостереження встановлено, що носіями патологічного РР алейю поліморфного варіанта гену p53 найчастіше були хворі на рак молочної залози.

Аналіз варіацій генотипів p53 у групі хворих на рак молочної залози, показав, що найбільш розповсюдженим варіантом був гомозиготний за поліморфізмом гену p53 (табл. 3). Гетерозиготи склали 52%. Інші комбінації генотипів зустрічалися значно рідше: комбінація мутантних РР -



70 81 85 88 98 100 101 102 103 104 105



106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116

Рис. 1. Генотипування мутацій у гені p53. Результати електрофоретичного розділення рестриктних фрагментів ДНК.

гомозигот була виявлена в 5 випадках у хворих на рак молочної залози, чотирьох випадках у родичів та чотирьох контрольної групи.

Висновки

Генотипування мутації гена p53 показано наявність мутантних гомозиготних варіантів у 5 (5%) хворих на рак молочної залози, 4 (8%) родичів I ступеня спорідненості та у 4 (8%) пацієнток контрольної групи.

Перспективи подальших досліджень

Вивчення мутацій білка p53 переконливі для молекулярно-генетичного моніторингу групи ризику захворювання на рак молочної залози.

Література. 1.Имянитов Е.Н. Наследственный рак молочной железы / Е.Н. Имянитов // *Практ онкол.* - 2010. - № 11(4). С. - 258-266. 2.Рак в Україні 2009 - 2010. Захворюваність, смертність, показники діяльності онкологічної служби. Бюл нац канцер-реєстру в Україні. - 2011. - № 12. - С. 50-51. 3.Расси Х. Изучение частоты мутаций в генах BRCA1 и BRCA2 у лиц с раком молочной железы из Ирана // Х. Расси / *Мат. науково-практичної конф. з міжнародною участю "Актуальні питання медичної генетики"*. - Київ, 2007. - С. 107-108. 4.Шендрикова Т.А. Профилактическая аднексэктомия у носителей мутации в генах BRCA1 и BRCA2 (обзор литературы) / Т.А. Шендрикова, К.П. Лактионов, А.И. Василенко // *Опухоли женской репродуктивной системы.* - 2014. - №1. - С.69-73. 5.A Mutant-p53/Smad complex opposes p63 to empower TGFbeta-induced metastasis // M. Adorno, M. Cordenonsi, M. Montagner [et al.] // *Cell.* - 2009. - Vol.137. - P.87-98. 6.A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPSC cell genomic integrity / R.M. Marion, K. Strati, H. Li [et al.] // *Nature.* - 2009. - Vol.460. - P.1149-1153. 7.Benjamin C.L. P53 protein and pathogenesis of melanoma and nonmelanoma skin cancer / C.L. Benjamin, V.O. Melnikova, H.N. Ananthaswamy // *Adv Exp Med Biol.* - 2008. - Vol.624. - P.265-282. 8.Brosh R. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field / R. Brosh, V. Rotter // *Nat Rev Cancer.* - 2009. - Vol.9. - P.701-713. 9.Changes of serum p53 antibodies and clinical significance of radiotherapy for esophageal squamous cell carcinoma / H.Y. Cai, X.H. Wang, Y. Tian [et al.] // *World J Gastroenterol.* - 2008. - Vol.14. - P.4082-4096. 10.Clinical significance of p53 alterations in surgically treated

prostate cancers / T. Schlomm, L. Iwers, P. Kirstein [et al.] // *Mod Pathol.* - 2008. - Vol.21. - P.1371-1388. 11.Gain of function of a p53 hot spot mutation in a mouse model of Li-Fraumeni syndrome / G.A. Lang, T. Iwakuma, Y.A. Suh [et al.] // *Cell.* - 2004. - Vol. 119. - P.861-872. 12.Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database / A. Petitjean, E. Mathe, S. Kato [et al.] // *Hum Mutat.* - 2007. - Vol.28. - P.622-629. 13.Inactivation of the p53 tumor suppressor gene and activation of the Ras oncogene: cooperative events in tumorigenesis / H. Solomon, R. Brosh, Y. Buganim, V. Rotter // *Discov Med.* - 2010. - Vol.9. - P.448-454. 14.Levine A.J. The first 30 years of p53: growing ever more complex / A.J. Levine, M. Oren // *Nat Rev Cancer.* - 2009. - Vol.9. - P.749-758. 15.Muller P.A. p53 and its mutants in tumor cell migration and invasion / P.A. Muller, K.H. Vousden, J.C.Norman // *J Cell Biol.* - 2011. - Vol.192. - P.209-218. 16.Mutant p53 drives invasion by promoting integrin recycling / P.A. Muller, P.T. Caswell, B. Doyle [et al.] // *Cell.* - 2009. - Vol.139. - P.1327-1341. 17.Mutant p53 facilitates somatic cell reprogramming and augments the malignant potential of reprogrammed cells / R. Sarig, N. Rivlin, R. Brosh [et al.] // *J Exp Med.* - 2010. - Vol.207. - P.2127-2140. 18.Mutant p53 gain of function in two mouse models of Li-Fraumeni syndrome / K.P. Olive, D.A. Tuveson, Z.C. Ruhe [et al.] // *Cell.* - 2004. - Vol.119. - P.847-860. 19.Mutant p53 (R175H) upregulates Twist1 expression and promotes epithelial-mesenchymal transition in immortalized prostate cells / I. Kogan-Sakin, Y. Tabach, Y. Buganim [et al.] // *Cell Death Differ.* - 2011. - Vol. 18. - P.271-281. 20.Mutant p53(R270H) gain of function phenotype in a mouse model for oncogene-induced mammary carcinogenesis / C. Heinlein, F. Kreplut, J. Lohler [et al.] // *Int J Cancer.* - 2008. - Vol.122. - P.1701-1719.

МУТАЦИИ БЕЛКА P53 В КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ИХ БЛИЖАЙШИХ РОДСТВЕННИЦ

Т.В. Крук, А.П. Пересунько, Р.А. Волков

Резюме. В работе проведен анализ распределения аллельных вариантов и гепатитов гена-супрессора p53 в крови больных раком молочной железы и их родственниц I степени родства, который показал наличие мутантных вариантов этого гена у 5 (5%) больных, 4 (8%) родственников и 4 (8%) пациенток контрольной группы, показывает актуальность этого исследования для оценки риска возникновения рака и прогноза заболевания.

Ключевые слова: белок p53, рак молочной железы,

родственники, риск заболевания.

MUTATIONS OF P53 PROTEIN IN THE BLOOD OF THE PATIENTS WITH BREAST CANCER AND THEIR IMMEDIATE RELATIVES

T.V. Kruk, A.P. Peresun'ko, R.A. Volkov

Abstract. The analysis of the distribution of allelic variants and hepatitis suppressor gene p53 in the blood of breast cancer patients and their kinswomen of the 1st degree of consanguinity, which showed the presence of mutant variants of this gene in 5

(5%) patients, 4 (8%) relatives and 4 (8%) patients in the control group, showing the relevance of this study to assess the cancer risk and prognosis has been carried out.

Key words: p53, breast cancer, relatives, the risk of disease.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Yu. Fedkovic National University (Chernivtsi)

Clin. and experim. pathol.- 2014.- Vol.13, №4 (50).-P.59-62.

Надійшла до редакції 01.11.2014

Рецензент – проф. І.С. Давиденко

© T.V. Kruk, O.P. Peresun'ko, R.A. Volkov, 2014