

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СВЯЗИ АЛЛЕЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ГЕНОВ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА И ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К ОНКОЛОГИЧЕСКИМ ЗАБОЛЕВАНИЯМ

MOLECULAR GENETIC STUDY OF THE RELATIONSHIP BETWEEN THE ALLELIC STATE OF CELL CYCLE GENES AND THE PREDISPOSITION TO CANCER

**G. Galikeeva
E. Galimova
S. Lubina**

Summary. A study of the features of inheritance and interaction of genes regulating the cell cycle was carried out, as a result of which combinations of alleles of six genes (*Myc-L*, *p21*, *CDK4*, *CDK2*, *Rb1*, *ING1*), leading to a change in their expression, as well as a five-factor model of interaction of the studied genes were revealed. new, reflecting the mechanism of the formation of a high risk of developing oncopathology. The identified combinations of non-protective alleles of the genes of the cell cycle can be used to determine the risk of developing cancer.

Keywords: cell cycle, cancer, gene, allele, genotype, gene interaction, mutation, proliferation.

Галикеева Гузель Фанилевна

К.б.н., доцент, Башкирский Государственный Педагогический университет им. М. Акмуллы (г. Уфа)
galikeevagf@yandex.ru

Галимова Эльвира Мансуровна

К.б.н., доцент, Башкирский Государственный Педагогический университет им. М. Акмуллы (г. Уфа)
vetngen@gmail.com

Любина Светлана Викторовна

К.б.н., доцент, Башкирский Государственный Педагогический университет им. М. Акмуллы (г. Уфа)
landufa@yandex.ru

Аннотация. Проведено изучение особенностей наследования и взаимодействия генов регуляции клеточного цикла, в результате чего были выявлены сочетания аллелей шести генов (*Myc-L*, *p21*, *CDK4*, *CDK2*, *Rb1*, *ING1*), приводящие к изменению их экспрессии, а также пятифакторная модель взаимодействия изученных генов, отражающая механизм формирования высокого риска развития онкопатологии. Выявленные сочетания неprotectивных аллелей генов клеточного цикла могут использоваться при определении риска развития онкологических заболеваний.

Ключевые слова: клеточный цикл, онкологическое заболевание, ген, аллель, генотип, взаимодействие генов, мутация, пролиферация.

Введение

Клеточный цикл находится под строгим контролем системы регуляции, работа которой определяется особенностями экспрессии генов циклинов, циклинзависимых киназ, факторов транскрипции и онкосупрессоров. На протяжении клеточного цикла существует три основных «контрольно-пропускных пункта», которые существенны для перехода клетки из одной фазы клеточного цикла в другую [2].

Многочисленные исследования позволили выявить множество генов, контролирующих клеточный цикл, а мутации в этих генах приводят к модификации работы белкового каскада и, как следствие, срыву регуляторных механизмов контроля клеточного цикла. Активная пролиферация клеток с модифицированной работой генов-регуляторов клеточного деления, таких как *BRCA1*,

BRCA2, *TP53*, *ATM*, *RAD51*, *p21*, *Rb*, *CDK*, провоцируют злокачественное перерождение клеток, что лежит в основе такого сложного и многофакторного заболевания, как рак [1, 3, 8, 11].

Таким образом, в выявлении механизмов злокачественного перерождения клеток актуальным является изучение генов, регулирующих клеточный цикл и наиболее значимыми являются гены циклин-зависимых киназ (*CDK*), белка-ингибитора циклин-зависимой киназы 1A (*p21*), ретинобластомы (*Rb1*), белка-ингибитора клеточного роста (*ING1*), протоонкогенного белка (*Myc-L*), участвующие в каскадах реакций по поддержанию целостности генома и генетической стабильности клетки. Изменение их функциональной активности ведет к накоплению повреждений ДНК, изменению перехода от одной фазы клеточного цикла к другой и увеличению вероятности злокачественного перерождения клетки.

Цель исследования

Анализ аллельного взаимодействия и наследования генов, контролирующих клеточный цикл для установления особенностей их работы при формировании риска развития онкопатологии.

Материалы и методы

В работе использованы образцы ДНК 598 человек, проживающих в Республике Башкортостан. Из них 298 здоровых индивидов безотягощенного онкологического анамнеза и 300 онкологических больных, находившихся на стационарном лечении в ГБУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер» МЗ Республики Башкортостан. Для проведения семейного анализа были взяты образцы ДНК четырех семей (67 человек) как здоровых, так и имеющих онкологическое заболевание в ряду поколений. Анкетирование и сдача венозной крови для проведения генетических исследований проводилось с информированного и добровольного согласия исследуемых людей.

Выделение ДНК проводилось из периферической крови с помощью метода фенольно-хлороформной экстракции [9]. Амплификацию изученных локусов проводили с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) на амплификаторе «Терцик» в растворе объемом 10 мкл, содержащем 3,5 мкл Master Mix, 1,5 мкл праймеров, 1 мкл ДНК. Разделение продуктов амплификации и рестрикции проводили в 7% полиакриламидном геле.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программ MS Excel 2016 (Microsoft) и GMDR (Generalized Multifactor-Dimensionality Reduction) для моделирования ген-генных взаимодействий, а также таблиц сопряженности 2x2 (с поправкой Иэйтса).

Результаты исследования и их обсуждение

Генотипирование проводилось по шести полиморфным локусам генов клеточного цикла: *rs1059234* гена белка-ингибитора циклин-зависимой киназы 1A (*p21*), *rs2072052* гена циклин-зависимой киназы 4 (*CDK4*), *rs3087335* гена циклин-зависимой киназы 2 (*CDK2*), *rs137853294* гена ретинобластомы (*Rb1*), *rs121909250* гена белка-ингибитора клеточного роста (*ING1*), *rs3134613* гена протоонкогенного белка (*Myc-L*).

Анализ распределения частот генотипов и аллелей полиморфного локуса *rs2072052* гена *CDK4* выявил достоверно значимое повышение частоты гетерозиготного генотипа **A/*C* ($p=0,05$, $\chi^2=3,85$) и непротективного аллеля **C* ($p=0,02$, $\chi^2=5,3$) в группе онкобольных.

Белок CDK4 участвует в регуляции перехода клетки от G1 фазы клеточного цикла в S. Белок CDK4 и циклины D образуют комплексы D-CDK4 (DC), которые фосфорилируют и ингибируют белки ретинобластомы (RB), регулируют клеточный цикл, участвуют в контроле пролиферации клеток во время фазы G1. CDK4 ингибируется p16 (INK4a), также известным как циклин-зависимый ингибитор киназы-2 (CDKN2A) [15].

Полученные нами данные согласуются с литературными, в которых было установлено, что для людей с гетерозиготным генотипом **A/*C* по гену *CDK4* был выявлен повышенный риск развития рака мочевого пузыря [17], а у носителей непротективного аллеля **C* выявлена ассоциация с развитием рака кожи [10].

Попарное сравнение по полиморфному локусу *rs3087335* гена *CDK2* (*A/C*) показало статистически значимое повышение частоты гомозиготного генотипа **A/*A* и аллеля **A* в группе здоровых индивидов ($p=0,02$, $\chi^2=5,08$; $p=0,07$, $\chi^2=3,18$ соответственно) и достоверно значимое увеличение частоты генотипа **C/*C* ($p=0,15$, $\chi^2=2,01$) и аллеля **C* ($p=0,07$, $\chi^2=3,18$) в группе онкобольных.

Изученный генетический полиморфизм *rs3087335* (*A/C*) локализован в первом экзоне гена и приводит к замене тирозина на серин в 15 положении аминокислотной последовательности, что влияет на способность к фосфорилированию белков клеточного цикла: *CTNBN1*, *USP37*, *p53* / *TP53*, *NPM1*, *CDK7*, *RB1*, *BRCA2*, *MYC*, *NPAT*, *EZH2*.

При анализе полиморфного локуса *rs137853294* гена *Rb1* в группе онкобольных показано достоверно значимое повышение частоты гомозиготного генотипа **G/*G* ($p=0,0005$, $\chi^2=57,61$) и непротективного аллеля **G* ($p=0,0005$, $\chi^2=19,84$).

Изученный полиморфизм гена ретинобластомы (*RB1*) характеризуется нуклеотидной заменой, приводящей к образованию белка с измененной функцией. Белок RB1, содержащий в своем составе аминокислоту Arg в 661 положении более эффективно вызывает индукцию апоптоза [13]. В 2013 г. Raquel с сотрудниками при установили достоверное повышение частоты гомозиготного генотипа **G/*G* у пациентов с раком мочевого пузыря, что подтверждает ассоциацию аллеля **G* с развитием рака различной локализации [12].

Попарное сравнение частот генотипов и аллелей полиморфного локуса *rs121909250* гена *ING1* выявило достоверно значимое повышение частоты гомозиготного генотипа **G/*G* ($p=0,0005$, $\chi^2=130,38$) и аллеля **G* ($p=0,0005$, $\chi^2=67,3$) в группе онкобольных.

Согласно литературным данным, аллель *G приводит к образованию белка, не способного сформировать нормальную трехмерную структуру, и как следствие выполнять основную свою функцию — регуляция процессов транскрипции генов-мишеней, которые необходимы для остановки клеточного цикла и реализации апоптоза [4, 5]. Также в литературе встречаются данные, что аллель *G ассоциирован с раком головного мозга [6].

Выявленное достоверно значимое увеличение частоты генотипа *G/*G ($p=0,001$, $\chi^2=6,71$) и аллеля *G ($p=0,003$, $\chi^2=4,75$) полиморфного локуса rs3134613 гена *Myc-L* в группе онкобольных объясняется сверхэкспрессией гена *Myc-l*, что определяет развитие ряда изменений, которые влияют на пролиферацию, рост и метаболизм в клетке, репликацию ДНК, регуляцию клеточного цикла, клеточную адгезию, дифференцировку и развитие метастаз [16]. Исследования ранних лет показали ассоциацию генотипа *G/*G гена *Myc-L* (rs3134613) с риском развития рака легкого связан с метастазированием лимфатических узлов, а у пациентов с онкопатологией различной локализации данный генотип ассоциирован с рецидивом опухоли [14].

В результате анализа по полиморфному локусу rs1059234 гена *p21* было выявлено статистически значимое повышение гетерозиготного генотипа *C/*T и аллеля *T ($p=0,001$, $\chi^2=12,79$; $p=0,0009$, $\chi^2=13,37$ соответственно) в группе онкобольных, а также значимое повышение частоты гомозиготного генотипа *C/*C в группе здоровых индивидов ($p=0,0006$, $\chi^2=16,42$). Согласно литературным данным, аллель *T кодирует транскрипт со сниженной способностью передачи сигнала необходимого для процессинга мРНК.

Злокачественное перерождение клетки — сложный многостадийный процесс, в который вовлечено нарушение многих регуляторных систем контроля целостности клеточных структур, в том числе генетического материала. Эта дезорганизация функционирования клетки обусловлена нарушением работы многих генов, поэтому для представления целостной картины патогенеза, был проведен анализ распределения частот сочетаний генотипов изученных генов и особенностей их взаимодействия. Определено, что в группе здоровых индивидов достоверно чаще встречалось сочетание генотипов *CT/AA/CG/TT/AA/CC* ($p=0,05$, $\chi^2=0,14$) полиморфных локусов генов *Rb1* (rs137853294), *CDK2* (rs3087335), *ING1* (rs121909250), *Myc-L* (rs3134613), *CDK4* (rs2072052) и *p21* (rs1059234). Рисковыми же сочетаниями являются сочетания генотипов *CT/AA/CG/GG/CC/CT* ($p=0,008$, $\chi^2=7,49$) и *TT/CC/GG/TG/AC/CT* ($p=0,004$, $\chi^2=9,78$), которые выявлены высокой частотой в группе онкобольных. Интересен тот факт, что выявлен-

ные у онкобольных значимые сочетания генотипов имеют в своем составе рисковые генотипы, исходя из чего можно сделать вывод о сочетанном влиянии нарушения работы генов клеточного цикла на риск развития онкопатологии.

Моделирование ген-генных взаимодействий для шести полиморфных локусов генов клеточного цикла позволило определить мажорные гены, вносящие наибольший вклад в формирование сочетанного риска развития онкопатологии. Исходя из результатов моделирования, аллельное состояние генов *ING1*, *Myc-L* и *p21* наиболее значимо в процессах злокачественного перерождения клетки, причем данные гены работают независимо друг от друга. Данный результат логичен и согласуется с фактическим участием данных генов в различных сигнальных путях регуляции клеточного цикла. Продукты генов *CDK4*, *CDK2* и *Rb1*, напротив, работают сопряженно и оказывают сочетанное влияние на формирование риска развития онкопатологии, что и подтвердили результаты исследования.

С помощью программы STRING 10.0 (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) был выполнен анализ взаимодействия белков, кодируемых изученными генами, осуществляющих регуляцию клеточного цикла на разных его этапах. Уровень взаимодействия оценивался, основываясь на общедоступные функциональные онтологии и базы данных KEGG, GO, PFAM, INTERPRO, BioGRID, PubMed и др (Szklarczyk, 2015). Анализ в программе STRING 10.0 по базе данных KEGG выявил высокую силу белок-белковых взаимодействий при регуляции клеточного цикла.

Генеалогический анализ трех поколений в четырех семьях с различным онкологическим анамнезом позволил определить особенности наследования изученных генов клеточного цикла. Так, члены семей, с отягощенным в отношении онкопатологии анамнезом, были носителями более 6 рисковых аллелей по изучаемым генам. Примечателен тот факт, что каждый индивид в таких семьях являлся носителем хотя бы одного гомозиготного генотипа по рисковым аллелям одного из генов клеточного цикла (*CDK4*, *CDK2*, *Rb1*, *ING1*, *Myc-L*, *p21*). Подобный генотипический статус членов семьи можно рассматривать как неблагоприятный в отношении риска развития онкопатологии.

Результаты проведенного исследования, доказывают высокий вклад рисковых аллелей генов *Rb1* (rs137853294), *CDK2* (rs3087335), *ING1* (rs121909250), *Myc-L* (rs3134613), *CDK4* (rs2072052) и *p21* (rs1059234) в формирование предрасположенности к развитию онкопатологии.

Заклучение

В результате проведенного исследования выявлены рискованные в отношении риска развития онкопатологий сочетания генотипов (*CT/AA/CG/GG/CC/CT* и *TT/CC/GG/TG/AC/CT*) изученных генов (*Myc-L/CDK2/CDK4/ING1/Rb1/p21* соответственно) клеточного цикла.

Шестилокусная модель межгенных взаимодействий указывает на приоритетное влияние аллельного состояния генов *Myc-L*, *ING1* и *p21* в формировании сочетанного риска развития онкопатологии.

Генеалогический анализ семей с различным онкологическим анамнезом подтверждает выявленные закономерности и подтверждает генетическую обусловленность заболевания.

Результаты исследования конкретизируют литературные данные о значимом влиянии генов клеточного цикла на процессы злокачественного перерождения клетки, являются готовой моделью генетического тестирования и могут быть использованы для превентивной диагностики, а также определения групп риска в отношении генетической предрасположенности к онкопатологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Клаг У., Каммингс М. Контроль клеточного цикла / Основы генетики. М: Техносфера, 2009. С. 58–59.
2. Копнин Б.П. Опухолевые супрессоры и мутаторные гены / Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН. Москва. 2005.
3. Aarts M, Linardopoulos S, Turner NC // *Curr Opin Pharmacol*. 2013 Aug;13 (4):529–35. doi: 10.1016/j.coph. 2013.03.012. Epub 2013 Apr15
4. Garkavtsev I, Boucher Y. An intact ING1-P53 pathway can potentiate the cytotoxic effects of taxol // *Cancer Biol Ther*. 2005. 4:48–49.
5. Garkavtsev I., Kazarov A., Gudkov A., Riabowol K. Suppression of the novel growth inhibitor p33 (ING1) promotes neoplastic transformation // *Nature Genet*. 14: 415–420, 1996. Note: Erratum: *Nature Genet*. 23: 373 only, 1999.
6. Gunduz M., Ouchid, M., Fukushima K., Hanafusa H., Etani T., Nishioka e Nishizaki, K., Shimizu, K. Genomic structure of the human ING1 gene and tumor-specific mutations detected in head and neck squamous cell carcinomas // *Cancer Res*. 60: 3143–3146, 2000. [PubMed: 10866301, related citations] [Full Text] 6. P. 539–545.
7. Gunduz M., Ouchida M., Fukushima K., Hanafusa H., Etani T., Nishioka e Nishizaki K., Shimizu K. Genomic structure of the human ING1 gene and tumor-specific mutations detected in head and neck squamous cell carcinomas // *Cancer Res*. 60: 3143–3146, 2000. [PubMed: 10866301, related citations] [Full Text] 6. P. 539–545.
8. Kastan M.B., Bartek J. *Nature*. 2004 Nov 18. 432(7015):316–23. (REVIEW)
9. Mathew C.C. The isolation of high molecular weight eucariotic DNA // *Methods in Molecular Biology*. 1984. — V.2. — P. 31–34.
10. Pjanova D.I., Engele L., Randerson-Moor J.A., Harland M., Bishop D.T., Newton Bishop J.A., Taylor C., Debnjak T., Lubinski J., Kleina R., Heisele O. CDKN2A and CDK4 variants in Latvian melanoma patients: analysis of a clinic- based population // *Melanoma Res*. 2007 Jun; 17(3): 185–91.
11. Poehlmann A., Roessner A. *Pathol Res Pract*. 2010 Sep 15; 206(9):591–601. doi: 10.1016/j.prp.2010.06.006. Epub 2010 Aug 1. (REVIEW)
12. Raquel H. Barbosa, Fernanda C.C. Aguiar, Morgana F.L. Silva, Regis A. Costa, Fernando R. Vargas, Evandro Lucena, M'irian Carvalho de Souza, Liz Maria de Almeida, Camila Bittar, Patr'icia Ashton Prolla, Cibele R. Bonvicino, I and He'ctor N. Seu'anezl, «Screening of RBI Alterations in Brazilian Patients With Retinoblastoma and Relatives With Retinoma: Phenotypic and Genotypic Associations» *IOVS j May 2013; Vol. 54; No. 5; 3184–3194.*
13. Sarder Nasir Uddin, Apurba Majumder, Khandker Khaldun Islam, Sk. Amir Hossain and Palash Kumar Sarker. Minimum Free Energy Based Evaluation of mRNAs Secondary Structures Constructed by 18 Clinically Significant Exonic Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) and Haplotypes of 5 Missense SNPs of RBI Gene // *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 2015, 11 (4): 191.199
14. Spinola M., Nomoto T., Manenti G., Falvella S., Brega Massone P.P., Conti B., et al. Linkage disequilibrium pattern in the L-myc gene in Italian and Japanese non-small-cell lung-cancer patients // *Int. Cancer*, 2001; 95:329–331.
15. Wang Z., Xie Y., Zhang L., Zhang H., An X., Wang T., Meng A. Migratory localization of cyclin D2-Cdk4 complex suggests a spatial regulation of the G1-S transition // *Cell Struct. Funct*. 33:171–183(2008).
16. William P. Tansey *New Journal of Science* Volume 2014. Article ID757534, 27 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2014/757534> Mammalian MYC Proteins and Cancer.
17. Yuanqing Ye, Hushan Yang, H. Barton Grossman, Colin Dinney, Xifeng Wu, Jian Gu. Genetic variants in cell cycle control pathway confer susceptibility to bladder cancer // *Cancer* Volume 112. Issue 11.1 June 2008. P. 2467–2474.

© Галикеева Гузель Фанилевна (galikeevagf@yandex.ru), Галимова Эльвира Мансуровна (vemgen@gmail.com),

Любина Светлана Викторовна (landufa@yandex.ru).

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»