

Ж.К. Чингисова

*Казахский научно-исследовательский институт онкологии и радиологии,
г. Алматы, Казахстан*

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПОЛИМОРФНЫХ ЛОКУСОВ ГЕНОВ BRCA1 И BRCA2 ПРИ РАКЕ ЭНДОМЕТРИЯ

ТҰЖЫРЫМДАМА

Зерттеу жатыр қатерлі ісігін емдеу тиімділігін болжау үшін геномнің құрылымдық-функционалдық ерекшеліктеріне молекулалық-генетикалық талдау жүргізуге бағытталған.

Зерттеу кейін анықталғаны BRCA1 генінің 356, 502, 1655 кодондары бар полиморфты локустары жалпы популяциялық полиморфизмнің өкілі есебінде таны-

лып, популяциялық зерттеулер мен жанұялық талдау кезінде онкологиялық ауруларға бейімділікті және даму қаупін анықтауда тиімді генетикалық маркер бола алған.

Маңызды сөздер: онкогинекологиялық қатерлі ісік, жатыр қатерлі ісігі, қатерлі ісікпен ауырған науқастардың өмір сүру ұзақтығы, болжау факторлары, молекулярлы маркерлер.

ABSTRACT

The researches dedicate to search the structural-functional futures of genomes for prognosis of effectiveness of treatment endometrial cancer by conducting with molecular-genetic methods/ In result the work we detected of BRCA1 gene polymorphism at codon 356, 502, 1655 are representative based polymorphism and could perform as effectiveness genetic marker in determine of predisposition risk

of tumor genesis in population-family history of diseases.

The presence 4553delA, 2683TTGAT of BRCA1 gene may correspond to different degrees of histological malignancy.

Keywords: oncogynecological cancer, with uterine cancer, the survival rate of patients with cancer, prognostic factors, molecular markers.

ВВЕДЕНИЕ

Открытие генов супрессоров опухолевого роста BRCA1 и BRCA2, герминальные мутации которых определяют наследственную форму ряда новообразований [1, 2] явилось одним из значительных достижений в молекулярно-генетических исследованиях рака.

Ген BRCA1 был картирован в районе 17q21 (1990г), соответствующий белок изолировали в 1994 году [3]. В клетках с дефектным BRCA1 наблюдается сильная генетическая нестабильность, т.е. повышение частоты возникновения спонтанных или индуцированных мутагенами генетических изменений – генных мутаций, хромосомных транслокаций, анеуплоидии и т.д.

Ген BRCA2 – классический опухолевый супрес-

сор, участвующий в контроле повреждения ДНК и в поддержании целостности генома. Ген BRCA2 кодирует ядерный фосфопротеин. Функциональная роль белка BRCA2 заключается в регуляции репарации ДНК и размножения клеток [4, 5].

На сегодня в определении полиморфных вариантов гена BRCA1, значимых для его инактивации, ведущая роль принадлежит ПЦР и ее модификациям, как одному из чувствительных и надежных методов молекулярно-генетического анализа [6].

В связи с этим выявление структурно-функциональных особенностей генов BRCA1 и BRCA2 при раке эндометрия является актуальным исследованием.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования был биологический материал (биоптат опухоли, кровь и послеоперационный материал – опухоль, прилегающая ткань), взятый от 11 больных раком эндометрия (раком тела матки, РТМ).

Выделение и очистку ДНК из набранного материала проводили сорбентным методом с помощью набора «ДНК-сорб-В» (Ампли-Сенс, Россия). Амплификацию с праймерами к выбранным участкам генов BRCA1 и BRCA2

РЕЗУЛЬТАТЫ

На первом этапе исследования изучили полиморфизм трех участков гена BRCA1. Проведенный анализ выявил три генотипа: гетерозиготный генотип RQ, два гомозиготных генотипа по аллелю дикого типа RR и мутантному аллелю QQ.

В результате получено, что данный вид полиморфизма в равной степени представлен во всех тканях в пределах одного организма и варьирует между разными пациентами. Частота каждого генотипа составила 0,05; 0,24 и 0,71 для RR, RQ и QQ, соответственно. Распределение частот аллелей составило 0,18 и 0,72 для аллелей R и Q, соответственно.

Кроме того, были проанализированы два локуса, несущих делеционный полиморфизм в 11 экзоне, кодон 502, порядковый нуклеотид 1623.

Мутантный аллель включал делецию пяти нуклеотидов.

Анализ показал, что частота мутантного аллеля полиморфных локусов гена BRCA1 в 11 экзоне составила 0,053, в 16 экзоне соответственно 0,073.

выполняли в Hybaid OmniGene термоциклере.

Детекцию ПЦР-продуктов проводили по интенсивности их свечения после электрофореза в 1% и 3% агарозном геле, стандартном полиакриламидном 6% и полиакриламидном денатурирующем с мочевиной 20% геле. Гели окрашивали бромистым этидием, визуализировали в ультрафиолетовом трансиллюминаторе и анализировали с помощью видеосистемы с программным обеспечением.

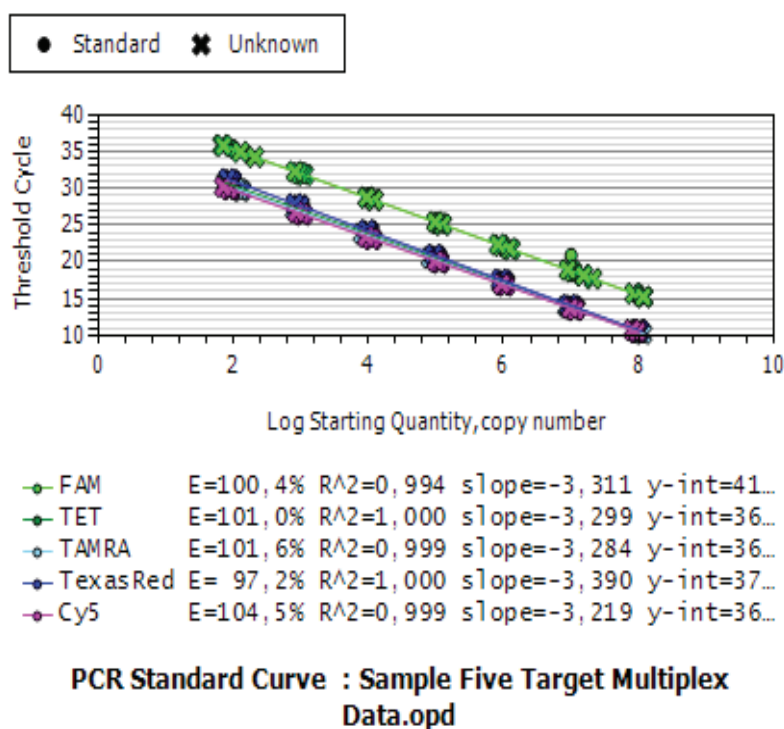
Не наблюдалось различий в распределении частот аллелей в разных тканях в пределах одного организма.

Следующим этапом детектировался инсерционно-делеционный полиморфизм на участках 659 гена BRCA2 и 5382 гена BRCA1 соответственно для инсерций и 6174 гена BRCA2 для делеции.

При таких точковых мутациях не всегда есть возможность провести детекцию продуктов амплификации, позволяющую выявить искомую мутацию.

В связи с этим была проведена отработка условий амплификации изучаемых фрагментов в режиме реального времени с использованием различных флюорисцентных меток.

Для проведения ПЦР в режиме реального времени были адаптированы следующие условия проведения анализа: температурный режим условий ПЦР; нормализация уровня оптического сигнала; концентрация компонентов реакционной смеси для проведения ПЦР в режиме реального времени



(рис.1)

Рисунок 1 - Адаптация условия ПЦР. Изменения уровня Ct при использовании различных флюорисцентных меток

После оптимизации условий проведен анализ по трем локусам в изучаемых образцах. Получаемые от прибора данные по анализу гена BRCA2 локус 6174delT позволяют проводить ПЦР в режиме реального времени, а также высокоточное плавление.

После оптимизации условий исследования был проведен анализ по трем локусам в изучаемых образцах (рис.2).

На рисунке представлены данные по анализу локусов генов BRCA1, BRCA2, получаемые от прибора, позволяющего проводить ПЦР в режиме ре-

ального времени, а также высокоточное плавление. Окна на панели прибора демонстрируют загрузку и кодировку образцов, первичные кривые плавления, нормализацию кривых плавления и выделения области дискриминации аллелей, а также определение генотипа мутантного, дикого типа и гетерозиготного (рис. 3). Таким образом, были отработаны условия проведения анализа и оптимизированы условия проведения ПЦР и высокоточного плавления, которые в дальнейшем и использовались в проводимом анализе исследуемых образцов.

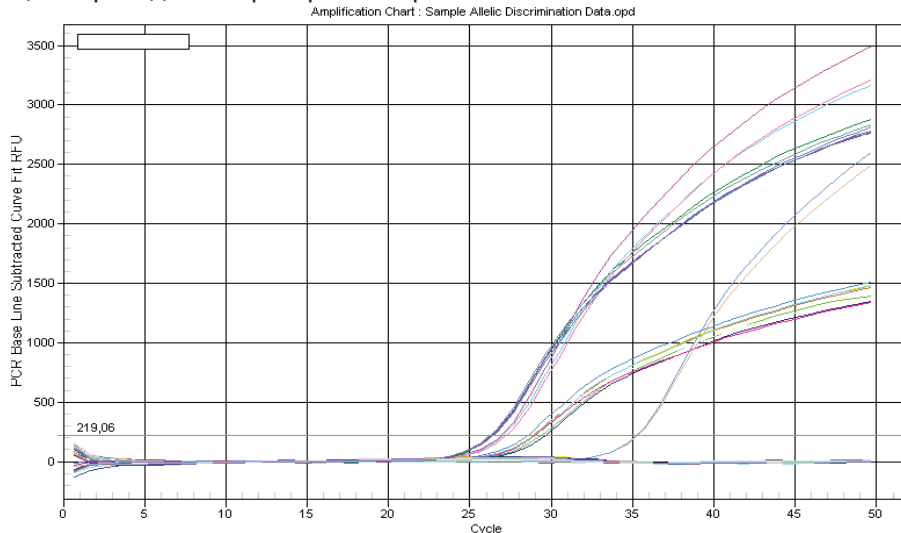


Рисунок 2 - Кривые высокоточного плавления образцов с различным процентным содержанием фрагментов мутантного и дикого типа

Обнаружение вышеперечисленных редких мутаций при полном секвенировании гена обычно связывается с увеличенным риском развития рака. Исследование (таблица 1) вариантов 4553delA, 2683TTGAT гена BRCA1 и 3242insT, 1528delAAAA

гена BRCA2 и соответствующих клинических проявлений в раковых опухолях показало, что наличие 4553delA, 2683TTGAT гена BRCA1 соответствует различным степеням гистологической злокачественности.

Таблица 1 - Результаты обследования пациентов с диагнозом рак эндометрия на наличие мутаций в генах BRCA1и BRCA 2.

№/№	1 б	2 к	2 о	3 п	3 к	3 о	4 п	4 о	5 п	5 о	6 п	6 о	7 б	7 о	7 п	8 б	8 о	8 п	9 о	9 п	10 о	10 п	11 к	11 о	11 п
Локус																									
4553delA	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
2683TTGAT	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-
3242insT	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
1528delAAAA	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-

Б-биопсия; О-опухолевая ткань; К-кровь

Таким образом, изучение полиморфных вариантов гена супрессора опухолевого роста BRCA у больных раком тела матки показало, что:

полиморфные локусы, содержащие кодоны 4553delA, 2683TTGAT гена BRCA1 и 3242insT, 1528delAAAA гена BRCA2 являются представителями общего популяционного полиморфизма и могут выступать в качестве эффективных генетических маркеров при определении как предрасположенности, так в ряде случаев для изучения риска разви-

тия онкологического заболевания в популяционных исследованиях.

В результате проведенного анализа определены частоты встречаемости мутантных аллелей от трех исследованных локусов в разных образцах (таблица 2). Проведен анализ изменения частотного распределения мутантного аллеля в разных группах изученных проб. В таблице 2 также приведены данные, полученные ранее при анализе трех локусов гена BRCA1, содержащих мутации в 356, 502 и 1655 кодона.

Таблица 2 - Результаты обследования пациентов РЖ на наличие мутаций в генах BRCA1/2

Ген	Местоположение мутации	n	Частота мутантного аллеля
BRCA1	356 кодон	2	0,18
BRCA1	502кодон	3	0,053
BRCA1	1655кодон	3	0,073
BRCA1	5382insC	3	3.9
BRCA2	695insT	1	0.24
BRCA2	6174delT	1	0.24

ВЫВОДЫ

Таким образом, изученные полиморфные локусы, содержащие кодоны 356, 502, 1655 гена BRCA1 являются представителями общего популяционного полиморфизма и могут выступать в качестве

эффективных генетических маркеров при определении предрасположенности и риска развития онкологических заболеваний в популяционных исследованиях и при семейном анализе.

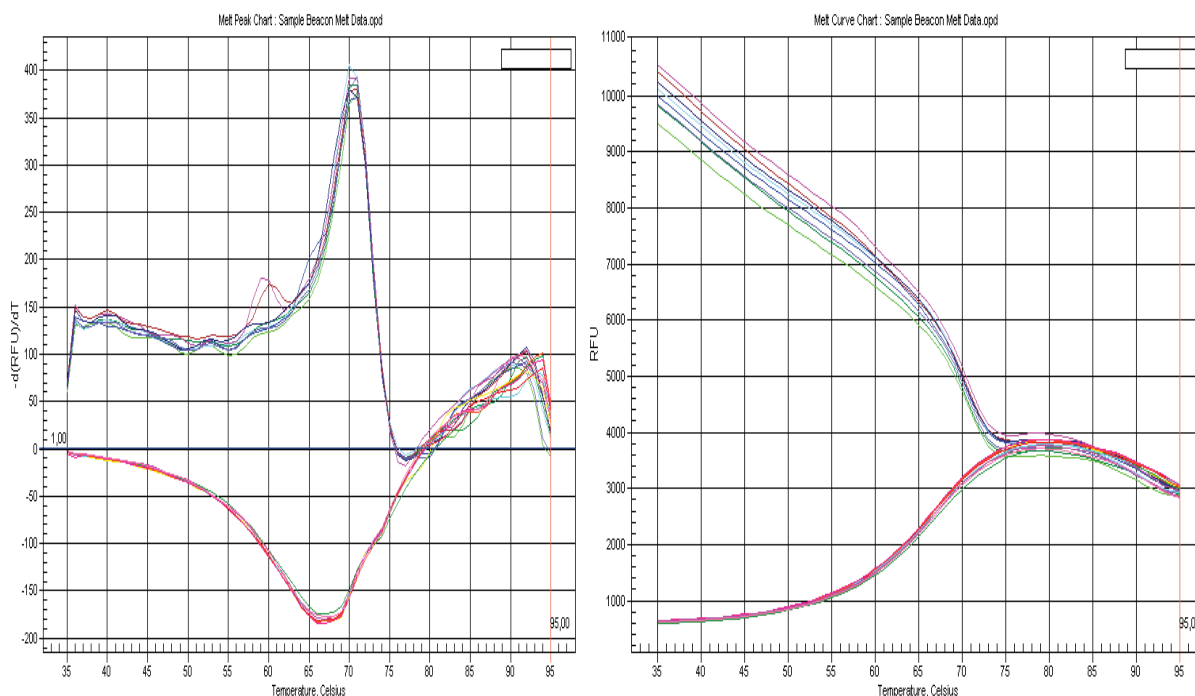


Рисунок 3 - Панель прибора, на которой изображены разные этапы анализа изучаемых локусов 4553delA, 2683TTGAT, 3242insT, 1528delAAAA генов BRCA1 и BRCA2

ЛИТЕРАТУРА:

- G.Ursin, B.E.Henderson, R.W.Haile e.a. Does oral contraceptive use increase the risk of breast cancer in women with BRCA1/BRCA2 mutations more than in other women? // Cancer Res.- 1997.- V. 57, N 17.- P. 3678 - 3681.
- Б.П.Копнин Мишени действия онкогенов и опухолевых супрессоров: ключ к пониманию базовых механизмов канцерогенеза // Биохимия. – 2000. - № 65. – С.5-33.
- Y Miki, J Swensen, D Shattuck-Eidens, Futreal, PA Harshman, K S Tavtigian, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. Science 1994;266:66-71.
- R.Wooster, G.Bignell, J.Lancaster et all. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2 // Nature. -2007.-№ 378.- P.789-792.
- L.Zheng, S.Li, T.G.Boyer, W.H.Lee Lesons learned from BRCA1 and BRCA2 // Oncogene. – 2000. – Vol. 19. –P 6159-6175.
- Elizabeth M.Rohlefs, William G. Learning, Kenneth J. Friedman, Fergus J. Couch, Barbara L.Weber, et al. Direct detection of mutations in the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1 by PCR-mediated site-directed mutagenesis Clinical Chemistry 43:1 24-29 (1997).