

Воропаева Е.Н.¹, Поспелова Т.И.², Воевода М.И.¹, Максимов В.Н.¹**РЕЗУЛЬТАТЫ КОМПЛЕКСНОГО АНАЛИЗА СТАТУСА ГЕНА TP53
У БОЛЬНЫХ ДИФУЗНОЙ В-КРУПНОКЛЕТОЧНОЙ ЛИМФОМОЙ**¹ ФГБНУ НИИ терапии и профилактической медицины, 630089, г. Новосибирск, Россия;² ГБОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России, 630089, г. Новосибирск, Россия

В настоящее время отсутствует комплексное описание изменчивости гена *TP53* при диффузной В-крупноклеточной лимфоме (В-ККЛ). В ходе проведенного исследования описаны частота, спектр и функциональная значимость мутаций в гене *TP53* у 74 больных диффузной В-ККЛ г. Новосибирска. Показано, что локализация «горячих точек» мутаций в обследованной выборке больных диффузной В-ККЛ отличалась от данных, представленных в IARC *TP53* mutation database. Выявлено наличие при диффузной В-ККЛ патогенетически значимых интронных и сэймсенс-замен. Частота метилирования промотора *TP53* в группе исследования составила 5,8%. Потеря гетерозиготности в гене наблюдалась у 25% больных диффузной В-ККЛ и была отмечена только в подгруппе больных с измененным статусом *TP53* (мутации или метилирование промотора). Полученные результаты свидетельствуют, что при диффузной В-ККЛ происходит селекция функционально значимых мутаций в участках *TP53*, кодирующих ДНК-связывающий регион, а недостаточность функции данного гена может формироваться по двухударному принципу.

Ключевые слова: диффузная В-крупноклеточная лимфома; ген *TP53*; метилирование промотора; потеря гетерозиготности; мутации; секвенирование.

Для цитирования: Воропаева Е.Н., Поспелова Т.И., Воевода М.И., Максимов В.Н. Результаты комплексного анализа статуса гена *TP53* у больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой. *Гематология и трансфузиология*. 2016; 61(3): 138-143. DOI: 10.18821/0234-5730-2016-61-3-138-143

Voropaeva E.N.¹, Pospelova T.I.², Voevoda M.I.¹, Maksimov V.N.¹**THE RESULTS OF COMPLEX ANALYSIS OF TP53 GENE STATUS IN PATIENTS
WITH DIFFUSE LARGE CELL LYMPHOMA**¹Institute of Internal and Preventive Medicine, Novosibirsk, 630089, Russian Federation;²Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, 630091, Russian Federation

Analysis of the literature shows that there is no comprehensive description of the variability of *TP53* gene in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). The frequency, spectrum and functional significance of mutations in the *TP53* gene were investigated at 74 DLBCL patients. The localization of mutations "hot spots" in the studied sample of patients with DLBCL was shown to be differed from the data presented in IARC *TP53* mutation database. The occurrence of DLBCL with pathogenetic intron and synonymous replacements was revealed. The frequency of *TP53* promoter methylation in the study group was 5.8%. The loss of heterozygosity in the gene was observed in 25% of cases and only in a subset of patients with modified (mutation or promoter methylation) status of the *TP53* gene. The results indicate to the selection of functionally significant mutations in the *TP53* DNA-binding region in DLBCL. The lack of function of the gene in DLBCL was shown to be possibly formed on the two-hit principle.

Key words: gene *TP53*; diffuse large B-cell lymphoma; promoter methylation; loss of heterozygosity; mutations; sequencing

For citation: Voropaeva E.N., Pospelova T.I., Voevoda M.I., Maksimov V.N. The results of comprehensive analysis of *TP53* gene status in patients with diffuse large cell lymphoma. *Hematology and Transfusiology. Russian journal (Gematologiya i transfusiologya)*. 2016; 61(3): 138-143. (in Russian). DOI:10.18821/0234-5730-2016-61-3-138-143

Funding. The study was executed with the financial support of the Grant of the President of Russian Federation for the State support of leading scientific schools "The role of molecular genetic factors in the formation of predisposition, tumor progression and development of complications of therapy of tumor diseases of the blood system. (project No 10240.2016.7).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 20 Apr 2016

Accepted 17 July 2016

Диффузная В-крупноклеточная лимфома (В-ККЛ) – опухоль, характеризующаяся диффузной пролиферацией атипичных крупных лимфоцитов с везикулярным ядром, ярко выраженными ядрышками и базофильной цитоплазмой. Диффузная В-ККЛ составляет около трети случаев неходжкинских лимфом взрослых: до 25–30% в развитых и 30–40% в развивающихся странах, что делает этот вариант лимфом одним из самых частых в мире [1].

Для корреспонденции:

Воропаева Елена Николаевна, кандидат мед. наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний ФГБНУ НИИ терапии и профилактической медицины, 630083, г. Новосибирск, Россия. E-mail: vena.81@mail.ru.

For correspondence:

Voropaeva Elena N., MD, PhD, Senior Researcher of the Laboratory of molecular genetic studies of therapeutic diseases of the Institute of Internal and Preventive Medicine, Novosibirsk, 630089, Russian Federation. E-mail: vena.81@mail.ru.

Information about authors:

Voropaeva E.N., <http://orcid.org/0000-0001-7542-7285>; Pospelova T.I., <http://orcid.org/0000-0002-1261-5470>; Voevoda M.I., <http://orcid.org/0000-0001-9425-413X>; Maksimov V.N., <https://orcid.org/0000-0002-7165-4496>.

Этиология диффузной В-ККЛ остается неизвестной. Среди факторов риска заболевания выделяют генетическую предрасположенность (наследственность, полиморфизм генов), коморбидные состояния (иммуносупрессия, инфицирование вирусом Эпштейна–Барр, хроническое воспаление), неблагоприятные воздействия внешней среды (ионизирующее излучение, солнечная радиация, пестициды) и ожирение [1, 2].

Одним из важнейших патогенетических механизмов, лежащих в основе развития В-ККЛ, является генетическая нестабильность клеток лимфоидного ряда как часть нормального развития В-лимфоцитов, которая может приводить к предопухолевым генетическим изменениям. В результате на одном из этапов созревания лимфоидных клеток происходит нарушение В-клеточного гомеостаза с неконтролируемой пролиферацией, блоком дифференцировки и имморализацией В-лимфоцита [3].

Генетические факторы, нарушающие репарацию ДНК или процесс программированной клеточной смерти, повышают вероятность возникновения предопухолевых событий. Повреждения генома В-лимфоцитов, которые не были репарированы или элиминированы путем апоптоза, в последующем могут модулироваться средовыми воздействиями, эпигенетическими факторами (гипо-гипер-

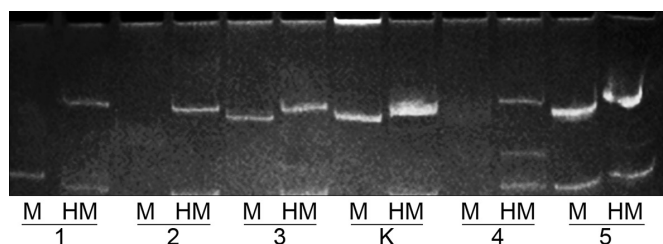


Рис. 1. Анализ статуса метилирования промотора гена *TP53*: результаты метилспецифической ПЦР с фланкирующими праймерами, электрофорез в 8% полиакриламидном геле.

М – ПЦР с праймерами, специфичными к метилированному аллелю (длина продукта 166 пн), НМ – ПЦР с праймерами, специфичными к неметилированному аллелю (длина продукта 170 пн), 1–5 номера случаев: 1, 2, 4 – норма; 3, 5 – метилирование; К – контрольные ДНК.

метилирование), сопутствующими заболеваниями (аутоиммунными), генетическим полиморфизмом и запустить дальнейшее развитие опухоли [4].

Белок p53 – ядерный фосфопротеин молекулярной массой 53 кД, основная роль которого заключается в обеспечении экстренного удаления поврежденных и потенциально опасных для организма клеток [5]. Опухольсупрессирующая функция его обусловлена участием в таких процессах, как контроль клеточного цикла, репарация ДНК, апоптоз, старение и аутофагия как через транскрипционно-зависимые, так и транскрипционно-независимые механизмы [6]. Под действием стресса лимфоциты склонны к p53-опосредованному апоптозу в отличие от других типов клеток, подверженных остановке клеточного цикла, p53-независимому апоптозу или некрозу [7]. По этой причине нарушение функции гена *TP53* является основополагающим для развития и прогрессии лимфопролиферативных заболеваний [7, 8].

В В-лимфоцитах с инактивацией *TP53* отмечается увеличение выраженности генетической нестабильности, являющейся промотором дальнейшей опухолевой прогрессии и ускользания злокачественной клетки от иммунной системы, а также терапевтического воздействия. В условиях дефицита его функции увеличивается темп поликлональной эволюции В-клеток с самыми разными генетическими аномалиями: измененным числом и перестройками хромосом, генными мутациями, амплификацией отдельных участков генома [9].

Дисфункция гена *TP53* может быть результатом нарушений в структуре самого гена, изменения процессов транскрипции и стабильности м-РНК, дефекта посттрансляционных модификаций и взаимодействий белка p53. Возможно, молекулярные механизмы на уровне молекулы ДНК, приводящие к дефициту *TP53*, включают генные мутации, метилирование промотора, аллельный дисбаланс и генетический полиморфизм [4].

Анализ базы данных dbSNP [10] показывает, что в гене *TP53* (данные на январь 2016 г.) было зарегистрировано около 700 вариантов однонуклеотидных замен, из них 50 цитируются в базе Pubmed, и только 83 полиморфизма имеют Global MAF более 1%: 4 – миссенс замены, 71 – интронные, 5 – 5'-нетранслируемой и 3 – 3'-нетранслируемой последовательности маркера [11].

Лишь 20 полиморфных вариантов гена *TP53* встречаются в популяции с частотой более 5% и могут представлять реальный клинический интерес. Большинство из них за редким исключением при биоинформационном предсказании не имеет функционального значения [12]. Некоторые из этих полиморфизмов *TP53* в популяциях человека вызывают значимое изменение функции p53, три из них (rs1042522, rs17878362 и rs1625895) хорошо изучены в плане функциональных характеристик, распространенности в популяции и ассоциации с риском опухолей [12]. Проведенные нами ранее исследования [13, 14] показали, что данные маркеры гена *TP53*, в том числе в составе гаплотипных групп, могут быть как факторами риска диффузной В-ККЛ, так и быть ассоциированными с прогрессией заболеваний и эффективностью противоопухолевой терапии.

Литературный поиск показывает, что делеция 17p13.1, приводящая к потере гетерозиготности (ПГ) в гене *TP53*, при диффузной В-ККЛ регистрировалась с большим разбросом частот между исследованиями: от 30,4 до 42% по данным китайских авторов [15–17], от 40 до 50,4% – в чешской [18, 19], 30,4% – арабской [20], 22,5% – австрийской популяциях [21]. Наименьшая (22,2%) частота делеции 17p13.1 была показана в исследовании International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study [22], объединяющем выборки больных 16 гематологических центров США, Швейцарии, Нидерландов, Германии, Италии и Испании.

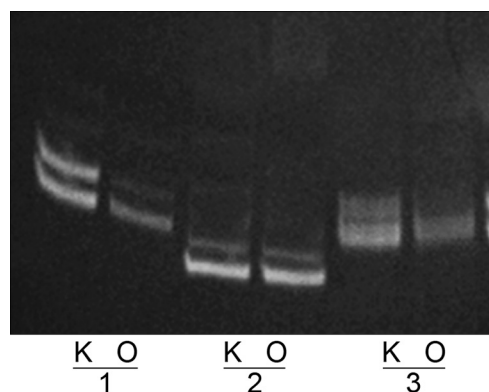


Рис. 2. Анализ микросателлитной нестабильности в локусе D17S796: результаты ПЦР с фланкирующими праймерами, электрофорез в 8% полиакриламидном геле (длина продукта 144–174 пн).

К – ДНК крови, О – ДНК опухолевой ткани, 1–3 номера случаев: 1, 3 – потеря гетерозиготности; 2 – норма.

Наиболее изученным аспектом изменчивости гена *TP53* при диффузной В-ККЛ является анализ его кодирующей последовательности на наличие мутаций. Показано, что частота мутаций в гене *TP53* при диффузной В-ККЛ достигает 20% и более [23].

В 1990 г. была организована база данных IARC *TP53* mutation database для регистрации мутаций в данном гене, которая в настоящее время содержит информацию о более чем 30 000 соматических мутаций и 700 мутациях зародышевой линии [24]. Ее анализ показывает, что при диффузной В-ККЛ в *TP53* описано более 120 мутаций. Из них 95% составили однонуклеотидные замены: 88% – миссенс, 7% – нонсенс-мутации, 5% – мутации со сдвигом рамки считывания. Более 95% мутаций было выявлено в экзонах 5–8 гена, мутации в экзонах 9–11 описаны не были. «Горячими точками» мутаций в гене *TP53* при диффузной В-ККЛ были следующие кодоны в порядке убывания частоты: 248, 273, 175, 245, 281, 244, 305, 249 и 297 [25].

Однако преобладание так называемых «горячих точек» может меняться в зависимости как от варианта опухоли, так и этнического происхождения исследуемой выборки пациентов [26]. Сравнительный анализ мутаций *TP53* показывает, что их частота и спектр при одном и том же типе онкологической патологии также могут значительно меняться в зависимости от исследуемой популяции [27]. Информация о российской популяции в текущей версии IARC *TP53* mutation database не представлена.

Подавляющее большинство работ, изучающих роль изменений в нуклеотидной последовательности *TP53*, было сосредоточено на анализе 5–8-го экзона гена. Интронные регионы не исследовались. Вместе с тем эти последовательности потенциально могут влиять не только на сплайсинг м-РНК, но и на экспрессию гена, нарушая авторегуляцию процессинга, нормальное прохождение посттранскрипционных модификаций м-РНК и посттрансляционных изменений белка [28–30].

Связь между гиперметилированием промотора *TP53* и снижением уровня транскрипции гена была показана на ряде опухолей [4, 31, 32]. Несмотря на широкое изучение метилирования данного гена при раках, этот вопрос менее изучен при гемобластозах и практически не разработан при лимфопролиферативных заболеваниях [4]. Например, при остром лимфобластном лейкозе метилирование промотора *TP53* регистрируют у трети пациентов [33], а при хроническом лимфолейкозе – в каждом пятом случае [4]. В литературе имеются лишь единичные сообщения о частоте метилирования промотора гена *TP53* при диффузной В-ККЛ [34]. Комплексное описание изменчивости гена *TP53* при диффузной В-ККЛ отсутствует.

Цель исследования – описать частоту гиперметилирования и потери гетерозиготности, а также частоту, спектр и функциональную значимость мутаций в кодирующих и интронных участках гена *TP53* у больных диффузной В-ККЛ г. Новосибирска.

Материал и методы

Группу обследования составили 74 больных диффузной В-ККЛ (35 мужчин и 39 женщин) в возрасте от 21 года до 78 лет (средний возраст $52,8 \pm 14,3$ года), госпитализированных в Городской гематологический центр г. Новосибирска за период 2012–2015 гг. 91% обследованных имели продвинутое (III и IV) стадии заболевания и 2/3 – неблагоприятный прогноз по Международному прогностическому индексу [35].

Исследование было одобрено локальным этическим комитетом. Все пациенты подписали информированное согласие до включения в исследование.

Общая характеристика результатов секвенирования

Интронные		В кодирующей последовательности гена <i>TP53</i>			
с неизвестным эффектом	влияние на плейсинг	нонсенс	сдвиг рамки считывания	миссенс	сеймсенс
IVS4-30T>C				p.L130F	
IVS5+43G>T				p.W146R*	
IVS5-17T>C				p.T155I*	p.V157V
IVS7+31G>C*				p.R156C	p.H179H
IVS8+10C>A*	IVS6-36G>C	p.R213X	p.A189Pfs	p.R196Q	p.L252L
IVS8+20A>G				p.G244S	p.V272V
IVS8+37A>G				p.V272E*	p.G302G
IVS9+12T>C*				p.A276V	p.A307A
(rs1800899)				p.G293R	

Примечание. * – мутации, встреченные в группе обследования дважды.

Геномная ДНК была выделена из парафиновых блоков биоптатов опухолевых лимфатических узлов и экстранодалных очагов поражения методом фенольно-хлороформной экстракции с применением гуанидина. На исследование брали срезы ткани, содержащие не менее 80–90% опухолевых клеток.

Прескрининг мутаций не проводили. Методом прямого секвенирования по Сэнгеру был выполнен анализ кодирующей последовательности гена *TP53* (с 5-го по 10-й экзоны) и примыкающих участков интронов, согласно IARC protocol (2010 update) [36]. На первом этапе проводили наработку отдельных фрагментов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием в качестве матрицы геномной ДНК. Полученные ампликоны подвергали очистке от солей, не включившихся праймеров и дезоксинуклеотидтрифосфатов на микроколонках с Sephadex G-50 medium ("GE Healthcare Bio-Sciences AB"). Секвенирование образцов осуществляли при помощи наборов BigDye® Terminator v3.1 ("Applied Biosystems") методом капиллярного электрофореза на аппарате Hitachi 3500 Genetic Analyzer ("Applied Biosystems"). Анализ результатов секвенирования, выравнивание и сопоставление с референсной последовательностью (NG_017013) осуществляли с применением программ Chromas, SeqScape v.2.7, Sequence Scanner. Анализ биологической значимости обнаруженных мутаций выполняли с помощью баз данных и инструментов IARC *TP53* Database и The *TP53* UMD mutation database in human cancer [24, 37]. Дополнительно был проведен биоинформационный анализ миссенс-мутаций с помощью on-line программы Polymorphism Phenotyping 2 (Polyphen-2) [38].

Таблица 3

Результаты функционального анализа миссенс-мутаций гена *TP53*

Мутация	Функциональный прогноз			Активность белка p53 в экспериментах <i>in vitro</i> [ссылка]
	PolyPhen-2 (характер мутации)	SIFT (характер мутации)	Mut_ass (степень патогенности)	
p.L130F	Возможно патогенная	Опасная	Высокая	Не активен [41]
p.W146R	Не патогенная	Нейтральная	Низкая	Незначительно снижена [41]
p.T155I	Возможно патогенная	Опасная	Средняя	Не активен [41–43]
p.R156C	Не патогенная	Нейтральная	Низкая	Гиперактивен [41, 44]
p.R196Q	Возможно патогенная	Опасная	Высокая	Не активен [45]
p.G244S	Возможно патогенная	Опасная	Средняя	Не активен [42, 46]
p.V272E	Возможно патогенная	Опасная	Высокая	Не активен [41]
p.A276V	Возможно патогенная	Опасная	Средняя	Не активен [43]
p.G293R	Не патогенная	Нейтральная	Средняя	Незначительно снижена [41]
p.A276V	Возможно патогенная	Опасная	Средняя	Не активен [45]
p.G293R	Не патогенная	Нейтральная	Средняя	Незначительно снижена [41]

Таблица 1

Сравнение спектра выявленных мутаций в гене *TP53* с данными базы IARC ($p > 0,05$)

Тип замены нуклеотида	Частота, %	
	в выборке	в базе данных мутаций в гене <i>TP53</i> IARC
GC>AT в CpG	15,6	26
GC>AT	34,4	25
GC>CG	3,1	8
GC>TA	9,4	10
AT>GC	12,5	13
AT>CG	12,5	5
AT>TA	12,5	8

Бисульфитную конверсию образцов ДНК осуществляли наборами EZ DNA Methylation Kit ("Zymo research", США) согласно протоколу производителя. В реакцию брали 300–500 нг ДНК.

Анализ статуса метилирования промотора гена *TP53* проводили методом метилспецифической ПЦР на бисульфитконвертированной ДНК в двух пробирках: с праймерами, специфичными к метилированному и неметилированному аллелю, согласно методике, описанной ранее [39]. По методологическим причинам анализ статуса метилирования промотора гена *TP53* методом метилспецифической ПЦР был выполнен у 69 больных диффузной В-ККЛ (рис. 1).

Оценку потери гетерозиготности в гене *TP53* проводили по микросателлитному локусу D17S796 методом ПЦР [40]. Для анализа были доступны 24 пары образцов опухолевой и нормальной ткани больных диффузной В-ККЛ группы исследования (рис. 2).

Сравнение частот типов нуклеотидных замен в гене *TP53* при диффузной В-ККЛ в обследованной выборке больных и в IARC *TP53* mutation database проводили с помощью статистических методов χ^2 -Пирсона и точного критерия Фишера. Различия между сравниваемыми параметрами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Мутации в кодирующей и интронных последовательностях гена *TP53*

В ходе анализа опухолевого материала от 74 больных диффузной В-ККЛ было выявлено 33 мутации: 21 в кодирующей, 12 в интронных последовательностях гена *TP53* (рис. 3, см. на обложке). Распределение мутаций было следующим (табл. 1): 1 (3%) мутация, приводящая к нарушению сплайсинга молекулы РНК, 11 (33%) – интронных с неизвестным эффектом, 12 (37%) – миссенс, 6 (18%) – сеймсенс, 2 (6%) – нонсенс-типа, 1 (3%) – мутация, приводящая к сдвигу рамки считывания в гене *TP53*.

Все находки за исключением A189Pfs (96,9%) представляли собой одонуклеотидные замены, 5 (15,6%) из которых были мутации типа GC>AT в CpG островках. Замены GC>AT составили 34,4%, GC>CG – 3,1%, GC>TA – 9,4%, AT>GC – 12,5%, AT>CG – 12,5%, AT>TA – 12,5%, что значимо не различается от данных, представленных в IARC *TP53* mutation database (табл. 2).

Все выявленные нами в исследуемой выборке больных диффузной В-ККЛ мутации в кодирующей последовательности гена *TP53* описаны ранее в IARC *TP53* mutation database [24] при других онкологических заболеваниях и были расположены в 5–8-м экзонах гена.

В обследованной выборке 4 (6,8%) больных имели множественные мутации, а ряд находок встречался неоднократно (в 2 случаях каждая): в кодирующей последовательности – p.W146R, p.T155I, p.V272E, p.R213X, в интронных областях IVS7+31G>C, IVS9+12T>C и IVS8+10C>A (см. табл. 1).

Анализ биологической значимости всех выявленных нами в исследуемой выборке больных диффузной В-ККЛ миссенс-мутаций в гене *TP53* показал следующие данные (табл. 3). Мутации p.L130F, p.T155I, p.R196Q, p.G244S, p.V272E, p.A276V, приводящие к появлению белка, утрачивающего функциональную активность, всеми тремя прогностическими программами были отнесены к повреждающим, вредным или с высокой/средней степенью опасности заменам. Тогда как мутации p.W146R и p.G293R, незначительно снижающие активность p53, а также p.R156C с гиперактивным продуктом, были отнесены к неопасным, нейтральным или с низкой/средней степенью опасности заменам.

Биологическая значимость мутаций p.R213X и p.A189Pfs не вызывает сомнений, поскольку обе они приводят к появлению усеченного белка p53 с нулевой активностью.

Сложнее оценить эффект сеймсенс-мутаций, выявленных в исследуемой выборке, поскольку они являются синонимическими

заменами нуклеотидов, которые характеризуются сохранением смысла кодирующего кодона. Согласно прогнозу *TP53* Mutant assessor, из сеймсенс-мутаций наибольшего внимания заслуживает замена p.A307A ввиду того, что 307-й кодон близок к концу экзона и потенциально может находиться в сайте сплайсинга молекулы РНК [47].

Функциональный эффект большинства интронных мутаций, выявленных в группе больных диффузной В-ККЛ, точно не известен. Одна из биологически значимых мутаций гена *TP53* (IVS6-36G>C) расположена в 6-м интроне гена. Она относится к изменениям, влияющим на сплайсинг, согласно The *TP53* UMD mutation database in human cancer [24]. В эксперименте *in vitro* было продемонстрировано, что данная замена в отсутствие изменений в кодирующей последовательности гена приводит к выживанию клеток в условиях химиотерапии и длительно ингибирует апоптоз [48].

Среди интронных мутаций также следует отметить IVS4-30T>C ввиду того, что в 4-м интроне *TP53* расположен альтернативный промотор гена, участвующий в синтезе изоформы delta133, которая в норме экспрессируется в лимфоидной ткани [49].

Анализ аллельного дисбаланса и статуса метилирования гена *TP53*

Частота метилирования промотора гена *TP53* в обследованной выборке из 69 больных диффузной В-ККЛ составила 4 (5,8%) и значительно не различалась ($p = 0,5663$) в подгруппах с мутантной – у 1 (4,2%) из 24 и нормальной структурой гена у 3 (6,7%) из 45.

Анализ ПГ в гене *TP53* по микросателлитному маркеру D17S796 был выполнен у 24 больных диффузной В-ККЛ группы исследования, из них у 13 человек обнаружены мутации, у 11 отсутствовали изменения в последовательности гена *TP53*. Были выявлены 6 (25%) случаев ПГ, из них 5 (83,3%) случаев ПГ приходились на больных, у которых в ходе секвенирования были выявлены мутации в последовательности 5–8-го экзона и прилегающих участков интронов *TP53*. В единственном случае ПГ у больного диффузной В-ККЛ без мутаций обнаружено метилирование промотора гена.

Обсуждение

Спектр однонуклеотидных замен, выявленных в группе больных диффузной В-ККЛ, значительно не различался с данными, представленными в IARC *TP53* mutation database. Преобладали (95%) мутации в участках гена *TP53*, кодирующих ДНК-связывающий регион. Мутация p.G293R – единственная из выявленных миссенс-замен, которая не затрагивает функциональнозначимого ДНК-связывающего домена p53.

Анализ базы данных IARC *TP53* mutation database показал, что все функционально значимые мутации, выявленные нами в группе обследования, были описаны ранее при широком круге новообразований человека. Кодоны 196 и 213 при всех опухолях и кодон 244 при гемобластозах вообще и диффузной В-ККЛ в частности являются «горячими точками» мутаций в гене *TP53* [25]. Более того, описаны случаи синдрома LiFraumeni [25], для которого характерно развитие первично-множественных злокачественных новообразований, вызванных герминогенными мутациями p.R213X, p.G244S, p.L130F и p.T155I, аналогичными описанным нами.

В ходе исследования за исключением 244-го кодона не выявлено мутаций в большей части кодонов (248, 273, 175, 245, 281, 305, 249 и 297), для которых в IARC *TP53* mutation database описано наибольшее количество мутаций в гене *TP53* при диффузной В-ККЛ. В анализируемой выборке больных кодоны 275, 155, 272 и 212 являлись «горячими точками» мутаций.

Анализ публикаций [44–46, 50], посвященных изучению последствий мутаций гена *TP53*, показывает, что каждая из них может иметь разнонаправленные эффекты на различные аспекты функционирования p53. Эти эффекты могут быть условно разделены на последствия для структурных характеристик белка, его биохимических свойств и биологической активности, а также в ряде случаев приводить к приобретению p53 новых функций, не свойственных белку нормального типа. Таким образом, каждая из мутантных форм белка является уникальным продуктом мутации и может сочетать в себе как усиление или снижение определенных видов активности p53, так и нарушение его структуры или приобретение белком новых свойств.

К появлению функционально неактивного белка p53 в обследованной выборке больных диффузной В-ККЛ приводили миссенс-

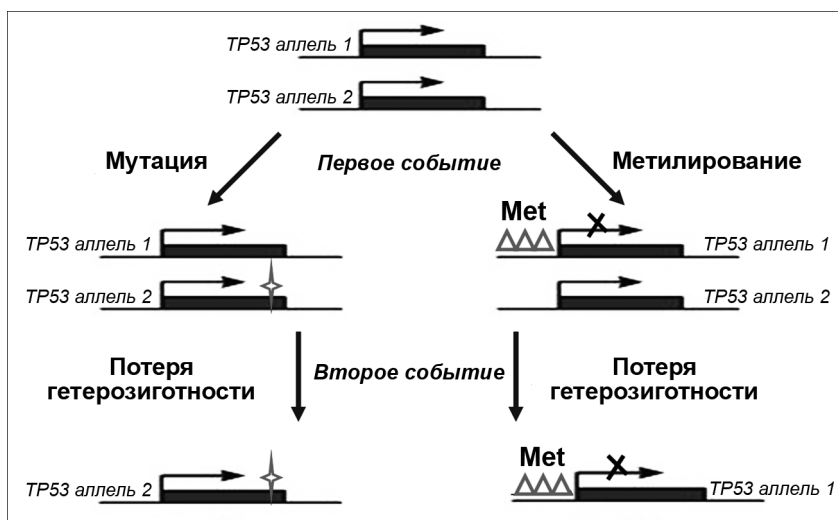


Рис. 4. Возможный двухударный механизм формирования дефицита функции гена *TP53* при диффузной В-ККЛ.

мутации p.L130F, p.T155I, p.R196Q, p.G244S, p.V272E и p.A276V наряду с мутацией p.A189Pfs, приводящей к сдвигу рамки считывания, нонсенс заменой p.R213X и сплайс-мутацией IVS6-36G>C. Все описанные выше события в кодирующей части гена приходятся на регионы, несущие информацию о высококонсервативных участках ДНК-связывающего домена белка, закрепленных эволюционно в филогенезе, и встречающихся в большинстве изоформ p53, а также структуре белков-гомологов p63 и p73.

Мутации p.R213X и p.G244S, а также p.V272E ранее уже были описаны при диффузной В-ККЛ [51, 52], а выявленная нами p.T155I ранее была зарегистрирована у нескольких больных ХЛЛ и ассоциирована с неблагоприятным прогнозом и низкой эффективностью его терапии [53]. Среди случаев с гемобластомами p.V272E ранее была описана при лимфоме Беркитта, болезни Ходжкина и В-клеточных НХЛ [25].

Все эти данные свидетельствуют о селекции p.L130F, p.T155I, p.R196Q, p.G244S, p.V272E, p.A276V, p.R213X и p.A189Pfs на этапах опухолевой прогрессии и не случайном их обнаружении у больных диффузной В-ККЛ.

По результатам анализа из выявленных в обследованной группе больных диффузной В-ККЛ лишь у 2 миссенс-замены (p.W146R и p.G293R) существенно не отражались на функции p53, а p.R156C приводил к появлению гиперактивного мутантного белка.

Из выявленных нами в группе больных диффузной В-ККЛ мутаций две могут влиять на сплайсинг молекулы РНК. К ним относятся сеймсенс-замена p.A307A и IVS6-36G>C. Функциональная значимость IVS6-36G>C была доказана в эксперименте *in vitro* [48]. Согласно прогнозу *TP53* Mutant assessor (release 1.00, 2012), p.A307A также находится в сайте сплайсинга молекулы РНК [47]. Несмотря на то что при сеймсенс-мутациях вновь образующийся кодон продолжает кодировать ту же аминокислоту, что обусловлено вырожденностью генетического кода, считается, что мутации данного типа могут менять сплайсинг, транскрипцию и стабильность РНК [24].

Функциональный эффект не затронутых в обсуждении интронных и сеймсенс-мутаций, выявленных в группе больных диффузной В-ККЛ, остается неизвестными. Вместе с тем они потенциально могут влиять не только на сплайсинг мРНК, но и на экспрессию гена, нарушая авторегуляцию процессинга [28]. Также среди интронных мутаций следует отметить IVS4-30T>C ввиду того, что в 4-м интроне *TP53* расположен альтернативный промотор гена, участвующий в синтезе изоформ delta133 и delta160 p53 [49].

Имеющиеся в литературе единичные сообщения о низкой частоте метилирования промотора гена *TP53* при диффузной В-ККЛ [34] были проверены на исследуемой группе больных г. Новосибирска. Частота метилирования промотора гена *TP53* в обследованной выборке больных диффузной В-ККЛ составила 5,8% и значительно не различалась в подгруппах с мутантной (4,2%) и нормальной (6,7%) структурой гена, а также от данных К. Амага и соавт. (3,7%) [34].

Анализ ПГ в гене *TP53* был выполнен у 24 больных диффузной В-ККЛ группы исследования, из них 13 человек имели мутации, 11 – отсутствие изменений в последовательности гена *TP53*. По данным анализа микросателлитного маркера D17S796, расположенного рядом с *TP53*, выявлены 6 (25%) случаев ПГ, что соответствовало данным литературы [22].

При этом ПГ наблюдалась только в подгруппе больных с измененным статусом гена *TP53* (мутации – у 5 больных или метилирование промотора – у 1 больного), что составило 6 (42,9%) из 14 против 0% в группе из 10 больных с интактным геном ($p = 0,0223$).

Комплексный анализ изменчивости гена показывает, что недостаточность функции *TP53* при диффузной В-ККЛ может формироваться по двухударному принципу. Согласно ему, для перехода нормальной В-клетки в опухолевую при возникновении по меньшей мере части случаев диффузной В-ККЛ могут быть необходимы два последовательных события (рис. 4). Первое событие – это мутация или метилирование промотора *TP53*, приводящие к образованию клетки с повышенным риском злокачественной трансформации. Для реализации опухолевого потенциала в клетке должно случиться второе событие – потеря неповрежденного аллеля гена.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о селекции при диффузной В-ККЛ функционально значимых мутаций в участках гена *TP53*, кодирующих ДНК-связывающий регион.

Локализация «горячих точек» мутаций в отличие от спектра однонуклеотидных замен в обследованной выборке больных диффузной В-ККЛ отличается от данных, представленных в IARC *TP53* mutation database.

Было показано наличие при диффузной В-ККЛ патогенетически значимых интронных и сеймсенс-замен, что свидетельствует о важности как анализа прилегающих к экзонам некодирующих участков гена, так и биоинформационного анализа выявленных синонимичных замен.

Комплексный анализ статуса *TP53* дает большее представление о возможных механизмах участия изменчивости данного гена в патогенезе диффузной В-ККЛ. Показано, что недостаточность функции *TP53* при диффузной В-ККЛ может формироваться по двухударному принципу.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки ведущих научных школ Российской Федерации (проект № НШ-10240.2016.7).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

9. Kopnin B.P., Kopnin P.B., Khromova N.V., Agapova L.S. Multifaced p53: variety of forms, functions, tumor-suppressive and oncogenic activities. *Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика*. 2008; 1(1): 2–9.
27. Глик Б., Пастернак Дж. *Молекулярная биотехнология. Принципы и применение*. Пер. с англ. М.: Мир; 2002.

Остальные источники литературы см. в References

REFERENCES

1. Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L., Jaffe E.S., Pileri S.A., Stain H., et al. WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon; 2008.
2. Niroula R., Butera J. Genetics and diffuse large B-cell lymphoma. *R. I. Med. J.* 2015; 98(11): 23–6.
3. Skibola C.F., Curry J.D., Nieters A. Genetic susceptibility to lymphoma. *Haematologica*. 2007; 92(7): 960–9.
4. Xu-Monette Z.Y., Medeiros L.J., Li Y., Orlowski R.Z., Andreeff M., Bueso-Ramos C.E., et al. Dysfunction of the TP53 tumor suppressor gene in lymphoid malignancies. *Blood*. 2012; 119(16): 3668–83. doi: 10.1182/blood-2011-11-366062.
5. Hollstein M., Hainaut P. Massively regulated genes: the example of TP53. *J. Pathol.* 2010; 220(2): 164–17. doi: 10.1002/path.2637.
6. Cheung K.J., Horsman D.E., Gascoyne R.D. The significance of TP53 in lymphoid malignancies: mutation prevalence, regulation, prognostic impact and potential as a therapeutic target. *Br. J. Haematol.* 2009; 146(3): 257–69. doi: 10.1111/j.1365-2141.2009.07739.x.
7. Gudkov A.V., Komarova E.A. The role of p53 in determining sensitivity to radiotherapy. *Nat. Rev. Cancer*. 2003; 3(2): 117–29.
8. Peller S., Rotter V. TP53 in hematological cancer: low incidence of mutations with significant clinical relevance. *Hum. Mutat.* 2003; 21(3): 277–84.
9. Kopnin B.P., Kopnin P.B., Khromova N.V., Agapova L.S. Multifaced p53: variety of forms, functions, tumor-suppressive and oncogenic activities. *Clinical Oncohematology: Basic Research and Clinical Practice. Russian Journal (Klinicheskaya onkogematologiya)*. 2008; 1(1): 2–9. (in Engl.)
10. Kitts A., Phan L., Ward M., Holmes J.B. The Database of Short Genetic Variation (dbSNP). The NCBI Handbook. 2nd ed. Bethesda: National Center for Biotechnology Information (US); 2013. (Last Update: April 3, 2014). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK174586/11>. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=TP53>
12. Whibley C., Pharoah P.D., Hollstein M. P53 polymorphisms: cancer implications. *Nature Rev. Cancer*. 2009; 9(2): 95–107.
13. Voropaeva E.N., Voevoda M.I., Pospelova T.I., Maksimov V.N. Linkage disequilibrium and haplotypes of rs1042522, rs1625895 and rs17878362 gene TP53 markers in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Mol. Biol. (Mosk)*. 2014; 48(5): 663–70.
14. Voropaeva E.N., Voevoda M.I., Pospelova T.I., Maksimov V.N. Prognostic

- impact of the TP53 rs1625895 polymorphism in DLBCL patients. *Br. J. Haematol.* 2015; 169(1): 32–5.
15. Lu J.T., Cen L., Zhou M. Prognostic value of P53 aberrations in diffuse large B-cell lymphoma. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2012; 20(1): 100–2.
16. Sun G.X., Cao X.S., Li Q., Wang Z.L. Correlation of BCL-6, MYC and p53 gene abnormalities with immunological subtypes and prognosis of diffuse large B-cell lymphoma. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. 2012; 29(5): 576–81.
17. Gao P., Li Q., Wang Z., Yan F., Lu C., Cao X. Significance of BCL-6, MYC, P53 genes abnormalities for the prognosis of diffuse large B-cell lymphoma. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. 2014; 31(5): 628–31. doi: 10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2014.01.020.
18. Stefancikova L., Moulis M., Fabian P., Vasova I., Zedek F., Ravcukova B., et al. Prognostic impact of p53 aberrations for R-CHOP-treated patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Int. J. Oncol.* 2011; 39(6): 1413–20.
19. Stocklein H., Smardova J., Macak J., Katzenberger T., Holler S., Wessendorf S., et al. Detailed mapping of chromosome 17p deletions reveals HIC1 as a novel tumor suppressor gene candidate telomeric to TP53 in diffuse large B-cell lymphoma. *Oncogene*. 2008; 27(18): 2613–25.
20. Tamimi Y., Al-Harthi S., Al-Haddabi I., Al-Kindi M., Babiker H., Al-Moundhri M., Burney I. The p53 mutation/deletion profile in a small cohort of the Omani population with diffuse large B-cell lymphoma. *Sultan Qaboos Univ. Med. J.* 2014; 14(1): e50–8.
21. Simonitsch-Klupp I., Hauser I., Ott G., Drach J., Ackermann J., Kaufmann J., et al. Diffuse large B-cell lymphomas with plasmablastic/plasmacytoid features are associated with TP53 deletions and poor clinical outcome. *Leukemia*. 2004; 18(1): 146–55.
22. Xu-Monette Z.Y., Wu L., Visco C., Tai Y.C., Tzankov A., Liu W.M., et al. Mutational profile and prognostic significance of TP53 in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP: report from an International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Blood*. 2012; 120(19): 3986–96.
23. Young K.H., Leroy K., Möller M.B., Colleoni G.W., Sánchez-Beato M., Kerbauf F.R., Haioun C., et al. Structural profiles of TP53 gene mutations predict clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma: an international collaborative study. *Blood*. 2008; 112(8): 3088–98.
24. Edlund K., Larsson O., Ameur A., Bunikis I., Gyllenstein U., Leroy B., et al. Data-driven unbiased curation of the TP53 tumor suppressor gene mutation database and validation by ultradeep sequencing of human tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012; 109(24): 9551–6.
25. <http://p53.iarc.fr/DownloadDataset.aspx>
26. Frebourg T., Barbier N., Kassel J., Ng Y.S., Romero P., Friend S.H. A functional screen for germ line P53 mutations based on transcriptional activation. *Cancer Res.* 1992; 52(24): 6976–8.
27. Tennis M., Krishnan S., Bonner M., Ambrosone C.B., Vena J.E., Moysich K., et al. p53 mutation analysis in breast tumors by a DNA microarray method. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2006; 15(1): 80–5.
28. Glick B.R., Pasternak J.J., eds. *Molecular biotechnology. Principles and applications of Recombinant DNA*. 2nd ed. Washington: ASM Press; 1994.
29. Lehman T.A., Haffty B.G., Carbone C.J., Bishop L.R., Gumbs A.A., Krishnan S., et al. Elevated frequency and functional activity of a specific germ-line p53 intron mutation in familial breast cancer. *Cancer Res.* 2000; 60(4): 1062–9.
30. Agirre X., Novo F.J., Calasanz M.J., Larrayoz M.J., Lahortiga I., Valganon M., et al. TP53 is frequently altered by methylation, mutation, and/or deletion in acute lymphoblastic leukaemia. *Mol. Carcinog.* 2003; 38(4): 201–8.
31. Pogribny I.P., James S.J. Reduction of p53 gene expression in human primary hepatocellular carcinoma is associated with promoter region methylation without coding region mutation. *Cancer Lett.* 2002; 176(2): 169–74.
32. Kang J.H., Kim S.J., Noh D.Y., Park I.A., Choe K.J., Yoo O.J., Kang H.S. Methylation in the p53 promoter is a supplementary route to breast carcinogenesis: correlation between CpG methylation in the p53 promoter and the mutation of the p53 gene in the progression from ductal carcinoma in situ to invasive ductal carcinoma. *Lab. Invest.* 2001; 81(4): 573–9.
33. Garcia-Delgado M., Larrayoz M.J., Novo F.J. Methylation of CpG dinucleotides and/or CCWGG motifs at the promoter of TP53 correlates with decreased gene expression in a subset of acute lymphoblastic leukemia patients. *Oncogene*. 2003; 22(7): 1070–2.
34. Amara K., Trimeche M., Ziadi S., Laatri A., Hachana M., Sriha B., et al. Presence of simian virus 40 DNA sequences in diffuse large B-cell lymphomas in Tunisia correlates with aberrant promoter hypermethylation of multiple tumor suppressor genes. *Int. J. Cancer*. 2007; 121(12): 2693–702.
35. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *N. Engl. J. Med.* 1993; 329(14): 987–94.
36. http://p53.iarc.fr/download/tp53_directsequencing_iarc.pdf
37. Petitjean A., Mathe E., Kato S., Ishioka C., Tavtigian S. V., Hainaut P., et al. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum. Mutat.* 2007; 28(6): 622–9.
38. Adzhubei I., Jordan D.M., Sunyaev S.R. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr. Protoc. Hum. Genet.* 2013; Ch.7: Unit 7.20. doi: 10.1002/0471142905.hg0720s76.
39. Almeida L.O., Custódio A.C., Pinto G.R., Santos M.J., Almeida J.R., Clara C.A., et al. Polymorphisms and DNA methylation of gene TP53 associated with extra-axial brain tumors. *Genet. Mol. Res.* 2009; 8(1): 8–18.
40. Grebe S.K., McIver B., Hay I.D., Wu P.S., Maciel L.M., Drabkin H.A., et al.

- Frequent loss of heterozygosity on chromosomes 3p and 17p without VHL or p53 mutations suggests involvement of unidentified tumor suppressor genes in follicular thyroid carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1997; 82(11): 3684–91.
41. Shiraishi K., Kato S., Han S.Y., Liu W., Otsuka K., Sakayori M., et al. Isolation of temperature-sensitive p53 mutations from a comprehensive missense mutation library. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(1): 348–55.
 42. Monti P., Campomenosi P., Ciribilli Y., Iannone R., Inga A., Abbondandolo A., et al. Tumour p53 mutations exhibit promoter selective dominance over wild type p53. *Oncogene*. 2002; 21(11): 1641–8.
 43. Campomenosi P., Monti P., Aprile A., Abbondandolo A., Frebourg T., Gold B., et al. P53 mutants can often transactivate promoters containing gap21 but not Bax or PIG3 responsive elements. *Oncogene*. 2001; 20(27): 3573–9.
 44. Kakudo Y., Shibata H., Otsuka K., Kato S., Ishioka C. Lack of correlation between p53-dependent transcriptional activity and the ability to induce apoptosis among 179 mutant p53s. *Cancer Res.* 2005; 65(6): 2108–14.
 45. Monti P., Campomenosi P., Ciribilli Y., Iannone R., Aprile A., Inga A., et al. Characterization of the p53 mutants ability to inhibit p73 beta transactivation using a yeast-based functional assay. *Oncogene*. 2003; 22(34): 5252–60.
 46. Dearth L.R., Qian H., Wang T., Baroni T.E., Zeng J., Chen S.W., et al. Inactive full-length p53 mutants lacking dominant wild-type p53 inhibition highlight loss of heterozygosity as an important aspect of p53 status in human cancers. *Carcinogenesis*. 2007; 28(2): 289–98.
 47. Leroy B., Fournier J.L., Ishioka C., Monti P., Inga A., Fronza G., Soussi T. The TP53 website: an integrative resource centre for the TP53 mutation database and TP53 mutant analysis. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41 (Database issue): D962–9. doi: 10.1093/nar/gks1033.
 48. Lehman T.A., Haffty B.G., Carbone C.J., Bishop L.R., Gumbs A.A., Krishnan S., et al. Elevated frequency and functional activity of a specific germ-line p53 intron mutation in familial breast cancer. *Cancer Res.* 2000; 60(4): 1062–9.
 49. Bourdon J.C., Fernandes K., Murray-Zmijewski F., Liu G., Diot A., Xirodimas D.P., et al. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev.* 2005; 19(18): 2122–37.
 50. Dekairelle A.F., Tombal B., Cosyns J.P., Gala J.L. Assessment of the transcriptional activity of p53 improves the prediction of recurrence in superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Clin. Cancer Res.* 2005; 11(13): 4724–32.
 51. Young K.H., Weisenburger D.D., Dave B.J., Smith L., Sanger W., Iqbal J., et al. Mutations in the DNA-binding codons of TP53, which are associated with decreased expression of TRAIL receptor-2, predict for poor survival in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2007; 110(13): 4396–405.
 52. Stefancikova L., Moulis M., Fabian P., Vasova I., Zedek F., Ravcukova B., et al. Prognostic impact of p53 aberrations for R-CHOP-treated patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Int. J. Oncol.* 2011; 39(6): 1413–20.
 53. Zenz T., Eichhorst B., Busch R., Denzel T., Habe S., Winkler D., et al. TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2010; 28(29): 4473–9.

Поступила 22.04.16

Принята к печати 17.07.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.419-036.11-092:575.174.015.3

Горбенко А.С.¹, Столяр М.А.^{1,3}, Субботина Т.Н.^{1,3}, Васильев Е.В.⁴, Ольховский И.А.^{1,2}

РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМА ARG399GLN ГЕНА XRCC1 В ПАТОГЕНЕЗЕ ХРОНИЧЕСКИХ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

¹Красноярский филиал ФГБУ Гематологический научный центр Минздрава России, 660036, г. Красноярск, Россия;²ФГБУН Красноярский научный Центр Сибирского отделения РАН, 660036, г. Красноярск, Россия;³ФГАОУ ВПО Сибирский федеральный университет, 660041, г. Красноярск, Россия;⁴КГБУЗ Краевая клиническая больница, 660022, г. Красноярск, Россия

Для оценки ассоциации полиморфизма Arg399Gln гена XRCC1 с хроническими миелопролиферативными заболеваниями были обследованы 466 человек, в том числе: 79 больных хроническим миелолейкозом (ХМЛ), 91 – истинной полицитемией (ИП), 132 – эссенциальной тромбоцитемией (ЭТ), 50 – миелофиброзом (МФ). Группу контроля составили 114 здоровых добровольцев. Показано, что распространенность минорного аллеля Gln в группе больных ХМЛ значимо выше (OR 1,53; 95% CI 0,67–3,51), особенно в группе больных с резистентностью к иматинибу (1,83; 95% CI 0,83–4,05), чем в группе контроля. Впервые выявлена взаимосвязь минорного полиморфизма исследуемого гена с ЭТ (OR 1,31; 95% CI 0,61–2,78), но не с ИП или МФ. Ассоциации полиморфных вариантов гена XRCC1 с уровнем аллельной нагрузки JAK2 не обнаружено. Полученные результаты свидетельствуют о более важном значении продукта данного гена в контроле стабильности генома дифференцировки миелоидных клеток-предшественниц при ХМЛ и ЭТ. Исследование полиморфизма Arg399Gln в гене XRCC1 может быть полезно в комплексной оценке прогноза развития и эффективности лечения этих заболеваний.

Ключевые слова: XRCC1 Arg399Gln; хроническая миелоидная лейкемия; истинная полицитемия; эссенциальная тромбоцитемия.

Для цитирования: Горбенко А.С., Столяр М.А., Субботина Т.Н., Васильев Е.В., Ольховский И.А. Роль полиморфизма Arg399Gln гена XRCC1 в патогенезе хронических миелопролиферативных заболеваний. *Гематология и трансфузиология*. 2016; 61(3): 143–145. DOI: 10.18821/0234-5730-2016-61-3-143-145

Gorbenko A.S.¹, Stolyar M.A.^{1,3}, Subbotina T.N.^{1,3}, Vasiliev E.V.⁴, Olkhovskiy I.A.^{1,2}

SIGNIFICANCE OF THE XRCC1 GENE ARG399GLN POLYMORPHISM IN THE PATHOGENESIS OF THE CHRONIC MYELOPROLIFERATIVE DISEASES

¹Hematological Scientific Centre (Krasnoyarsk branch), Krasnoyarsk, 660036, Russian Federation;²Krasnoyarsk Scientific Centre of the SB of RAS, Krasnoyarsk, 660036, Russian Federation;³Siberian Federal University, Krasnoyarsk, 660041, Russian Federation;⁴Krasnoyarsk Regional Hospital, Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation;

We investigated the association between Arg399Gln polymorphism in DNA repair gene XRCC1 and chronic myeloproliferative diseases. 79 patients with chronic myeloid leukemia (CML), 91 patient with polycythemia vera (PV), 132 patients with essential thrombocythemia (ET), 50 patients with myelofibrosis and 114 controls were included in the study. We genotyped the polymorphism in XRCC1 gene by using polymerase chain reaction in real-time with TaqMan assay. The detection and quantification of the JAK2 gene V617F mutation allele burden was carried out by means of "Pyromark q24" pyrosequencing. The presence of at least one XRCC1 399Gln allele was found to be significantly different in patients with CML (OR 1.53; 95% CI 0.67–3.51) and ET (OR 1.31; 95% CI 0.61–2.78) in comparison with controls. The presence of XRCC1 399Gln allele was associated with the resistance to imatinib. We found no interactions between the XRCC1 genotype and the level JAK2