

ТРОЙНЫЕ ГАПЛОТИПЫ ГЕНА *TP53* У БОЛЬНЫХ ДИФФУЗНОЙ В-МЕЛКОКЛЕТОЧНОЙ ЛИМФОМОЙ

© 2019 г. Е. Н. Воропаева^{1,*}, Н. В. Чердынцева², М. И. Воевода^{1,5},
Т. И. Поспелова³, В. Н. Максимов^{1,5}, Ю. Л. Орлов^{4,5}, Т. А. Агеева³

¹Федеральный исследовательский центр, Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Научно-исследовательский институт терапии
и профилактической медицины, Новосибирск, 630089 Россия

²Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук,
Научно-исследовательский институт онкологии, Томск, 634009 Россия

³Новосибирский государственный медицинский университет, Новосибирск, 630091 Россия

⁴Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, 119991 Россия

⁵Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: vena.81@mail.ru

Поступила в редакцию 04.02.2019 г.

После доработки 23.04.2019 г.

Принята к публикации 15.05.2019 г.

Роль генетической предрасположенности к развитию лимфом подтверждается накапливающимися данными об общих генетических вариантах генов, вовлеченных в лимфомогенез. Разнообразие вариантов заболевания, а также малый эффект каждого из вариантов полиморфизма требуют анализа данных маркеров при отдельных гистологических подтипах лимфом в составе гаплотипных групп. Проведен анализ частот rs1042522, rs1625895 и rs17878362, их тройного гаплотипа и неравновесия по сцеплению у больных диффузной В-мелкоклеточной лимфомой и в контрольной группе. Выявлено отсутствие выраженного неравновесия по сцеплению между маркерами rs17878362, rs1042522 и rs1625895 гена *TP53* в выборке популяционного контроля. Вместе с тем получены данные о выраженному сцеплении между rs1625895 и rs1042522, а также rs1625895 и rs17878362 и об умеренной силе сцепления между rs17878362 и rs1042522 в группе больных лимфомой. Обнаружена ассоциация гаплотипа *wArgG* в гомозиготном состоянии с предрасположенностью к развитию диффузной В-мелкоклеточной лимфомы.

Ключевые слова: ген *TP53*, гаплотипная структура, риск развития, неходжкинские лимфомы, неравновесие по сцеплению, rs17878362, rs1042522, rs1625895.

DOI: 10.1134/S0016675819120130

В-клеточные неходжкинские лимфомы (В-НХЛ) представляют собой разнообразную группу гематологических злокачественных новообразований, которые возникают из зрелых В-лимфоцитов. В каждом из 60 подтипов В-НХЛ существуют свои генетические особенности [1]. Роль генетической предрасположенности к развитию лимфом подтверждается накапливающимися данными об общих генетических вариантах генов, вовлеченных в лимфомогенез [2–5]. Однако частые генетические варианты имеют малый эффект на фенотип опухоли, и модель наследования В-НХЛ остается плохо изученной.

В последние годы применяют потенциально более продуктивные стратегии поиска генетических вариантов, ассоциированных с риском развития заболевания. В частности, анализируются

структурные неравновесия по сцеплению (LD) между маркерами и гаплотипная структура генов. Анализ гаплотипов дает возможность на более глубоком уровне оценить функциональное взаимодействие полиморфных локусов по аддитивному, потенцирующему и антагонистическому типу [6]. Если полиморфизм гена играет определенную роль в предрасположенности к заболеванию, то можно ожидать обнаружения различий в структуре неравновесия по сцеплению между локусами в группе больных и лиц контрольной выборки [7].

Ассоциация rs1042522, rs17878362 и rs1625895 антионкогена *TP53* с предрасположенностью к возникновению лимфом активно изучается в течение последних лет [3, 5, 8]. Однако получаемые при этом данные не всегда согласуются и не могут

считаться окончательными, что указывает на актуальность дальнейших исследований, расширяющих представления о роли генетического полиморфизма *TP53* в предрасположенности к В-НХЛ.

Расхождения в получаемых результатах могут быть связаны с тем, что риск развития опухолей обусловлен взаимодействием между генетическими и средовыми факторами. Различия в комбинации генетических особенностей (межгенных взаимодействий) и эндо-экзогенных факторов в популяциях разного этнического происхождения могут объяснить различия в предрасположенности к развитию опухолей [9]. Важно учитывать, что конечный эффект полиморфизма на функцию p53 может зависеть от типа опухолевых клеток [10].

rs1042522, rs17878362 и rs1625895 являются наиболее изученными функционально значимыми маркерами гена *TP53*. Известно, что данные маркеры имеют аддитивный эффект на функциональную активность p53 [11–13].

Данные о связи rs1042522 гена *TP53* с предрасположенностью к В-НХЛ были суммированы в метаанализе [14]. Однако ассоциация rs17878362 и rs1625895, в отличие от rs1042522, с риском В-НХЛ практически не изучена. Кроме того, высокое разнообразие лимфом требует анализа частот этих маркеров при отдельных гистологических вариантах заболевания, а малый эффект каждого полиморфизма в отдельности на риск развития заболевания – их оценки в составе гаплотипов.

Цель настоящей работы состояла в анализе частот маркеров rs1042522, rs1625895 и rs17878362, их тройного гаплотипа и неравновесия по сцеплению у больных диффузной В-мелкоклеточной лимфомой (ДВМКЛ) и у лиц контрольной группы – жителей города Новосибирска и Новосибирской области.

Группа исследования состояла из 70 больных ДВМКЛ Городского гематологического центра г. Новосибирска (39 мужчин и 31 женщина, средний возраст – 59.2 ± 7.3). Проведение работы было одобрено независимым комитетом по этике. Все больные дали письменное информированное согласие до начала исследования.

Анализировали ДНК, выделенную из мононуклеарных клеток периферической крови больных до начала активной полихимиотерапии. Генотипирование и гаплотипирование rs1042522, rs1625895 и rs17878362 проводили по методикам, описанным ранее [11, 15].

В контрольную группу, сопоставимую с группой больных по полу ($p = 0.923$) и возрасту ($p = 0.834$), вошли 374 человека без онкопатологии, жителей Новосибирска и Новосибирской области (206 мужчин и 168 женщин, средний возраст – 55.8 ± 13.1). Распределение частот генотипов изучаемых маркеров в контрольной выборке соответствовало равновесию Харди–Вайнберга.

Ассоциацию между определенными генотипами или гаплотипами и риском развития заболевания оценивали по величине отношения шансов (ОШ) с 95%-ным доверительным интервалом (ДИ). При сравнении частот аллелей, генотипов, гаплотипов и диплотипов использовали критерий χ^2 Пирсона. Различия между параметрами считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Статистическую обработку результатов осуществляли с применением пакета прикладных программ SPSS v. 16.0. Структуру неравновесия по сцеплению (LD) между маркерами rs1042522, rs1625895 и rs17878362 с определением коэффициента D' анализировали с применением программы MIDAS.

На первом этапе было оценено распределение частот аллелей и генотипов трех полиморфных маркеров гена *TP53* в группе больных ДВМКЛ и в контрольной выборке (табл. 1). Поскольку наследование большинства многофакторных заболеваний наиболее адекватно описывается в рамках трех моделей: мультиплекативной, общей и аддитивной, для каждой из этих моделей рассчитывали значения χ^2 , p , ОШ и 95% ДИ. С использованием всех моделей были получены близкие результаты, поэтому в табл. 1 приведены данные только для общей модели наследования. Таким образом, не обнаружено статистически значимых различий в распределении частот аллелей и генотипов rs1042522, rs1625895 и rs17878362 в группе больных ДВМКЛ и в контрольной выборке.

На втором этапе анализировали LD между rs1042522, rs1625895 и rs17878362 с расчетом коэффициента D' . Полученные результаты свидетельствуют о выраженном сцеплении между rs1625895 и rs1042522, а также rs1625895 и rs17878362 и об умеренной силе сцепления между rs17878362 и rs1042522 в группе больных ДВМКЛ. Значения коэффициента D' свидетельствуют о меньшей силе сцепления между тремя вариантами полиморфизма в контрольной выборке (табл. 2), что согласуется с результатами изучения данных маркеров у жителей Новосибирской и Томской областей другими авторами [16, 17].

В опубликованных ранее зарубежных исследованиях, хотя и отмечали высокую степень структурного сцепления между rs17878362, rs1042522 и rs1625895, было показано, что сила неравновесия по сцеплению между маркерами гена *TP53* может значительно варьировать в разных популяциях [18]. Также сравнение частот гаплотипов *TP53* у лиц различной этнической принадлежности выявило значимые различия между европейцами, афроамериканцами и латиноамериканцами [11].

Поскольку программа MIDAS на основе анализа эмпирически найденных генотипов дает возможность расчета частот лишь двойных гаплотипов, в ходе работы нами экспериментально бы-

Таблица 1. Распределение частот аллелей и генотипов трех изученных вариантов полиморфизма гена TP53 в группе больных ДВМКЛ и контрольной выборке

Полиморфизм			Частота, %		Риск ДВМКЛ		
			ДВМКЛ	контроль	χ^2	<i>p</i>	ОШ (95% ДИ)
rs1042522	Генотип	<i>Arg/Arg</i>	36 (51.4)	170 (45.5)	1.72	0.42	1.27 (0.76–1.12)
		<i>Arg/Pro</i>	29 (41.4)	159 (42.5)			0.96 (0.57–1.61)
		<i>Pro/Pro</i>	5 (7.1)	45 (12.0)			0.56 (0.22–1.47)
	Аллель	<i>Arg</i>	101 (72.1)	499 (66.7)	1.59	0.21	1.29 (0.87–1.93)
		<i>Pro</i>	39 (27.9)	249 (33.3)			0.77 (0.52–1.15)
	Генотип	<i>w/w</i>	53 (75.7)	283 (75.7)	0.07	0.96	1.00 (0.55–1.82)
		<i>w/dup</i>	16 (22.9)	87 (23.3)			0.98 (0.53–1.79)
		<i>dup/dup</i>	1 (1.4)	4 (1.1)			1.34 (0.15–12.18)
rs17878362	Аллель	<i>w</i>	122 (87.1)	653 (87.3)	0.00	0.96	0.99 (0.57–1.69)
		<i>dup</i>	18 (12.7)	95 (12.7)			1.01 (0.59–1.74)
	Генотип	<i>G/G</i>	53 (75.7)	294 (78.6)	0.31	0.85	0.85 (0.47–1.55)
		<i>G/A</i>	16 (22.9)	76 (20.3)			1.16 (0.63–2.14)
rs1625895	Аллель	<i>A/A</i>	1 (1.4)	4 (1.1)	0.31	0.58	1.34 (0.15–12.18)
		<i>G</i>	122 (87.1)	644 (88.8)			0.86 (0.50–1.48)
		<i>A</i>	18 (12.7)	84 (11.2)			1.17 (0.68–2.01)

Примечание. χ^2 , *p*, ОШ и ДИ приведены для общей модели наследования.

Таблица 2. Степень структурного сцепления между rs17878362, rs1042522 и rs1625895 в группе больных ДВМКЛ и контрольной выборке

Полиморфизм	Больные ДВМКЛ		Контрольная группа	
	rs1042522	rs1625895	rs1042522	rs1625895
rs17878362	0.71 ≤0.01	0.80 ≤0.0005	0.57 ≤0.0005	0.47 ≤0.0001
rs1042522	—	0.91 ≤0.0001	—	0.42 ≤0.001

Примечание. Приведены значения коэффициента неравновесия по сцеплению D' между изучаемыми маркерами и уровень значимости *p*.

ли определены сцепленные аллели трех изучаемых вариантов полиморфизма в пределах одной хромосомы (исследована структура тройных гаплотипов) у всех больных и лиц контрольной группы. Также было проанализировано распределение сочетаний гаплотипов – диплотипы (под диплотипом понимается сочетание двух гаплотипов у определенного человека).

Распределение частот гаплотипов и диплотипов по трем изученным биаллельным маркерам приведено в табл. 3. Из табл. 3 видно заметное повышение частоты гаплотипа *wArgG* (*p* = 0.045) в группе больных ДВМКЛ в сравнении с контрольной выборкой. При этом риск развития ДМКЛ был повышен только у носителей диплотипа

wArgG в гомозиготном состоянии (ОШ = 1.69; 95% ДИ (1.01–2.83)) (табл. 3).

Полученные нами результаты о наибольшей частоте встречаемости гаплотипа *wArgG*, как в контрольной выборке, так и группе больных ДВМКЛ, согласуются с данными литературы. Определение тройных гаплотипов TP53 у жителей различных регионов России и Белоруссии показало, что во всех популяциях гаплотип *wArgG* был наиболее частым [19].

В нашей работе показано, что диплотип *wArgG* ассоциирован с риском развития ДВМКЛ только в гомозиготном состоянии. Ранее отмечалось также различие в эффектах изучаемого тройного

Таблица 3. Распределение частот гаплотипов и диплотипов гена *TP53* в группе больных ДВМКЛ и контрольной выборке

Гаплотип	Частота (%)		Риск ДВМКЛ		Диплотип	Частота		Риск ДВМКЛ	
	ДВМКЛ	контроль	<i>p</i>	ОШ (95% ДИ)		ДВМКЛ	контроль	<i>p</i>	ОШ (95% ДИ)
<i>wArgG</i>	98 (70.0)	457 (61.1)	0.046	1.49 (1.01; 2.2)	<i>wArgG</i> /любой	64	323	0.245	1.68 (0.69–4.09)
<i>wArgA</i>	0 (0)	21 (2.8)	0.061	1.19 (1.16; 1.23)	<i>wArgG/wArgG</i>	34	134	0.044	1.69 (1.01–2.83)
<i>wProG</i>	21 (15.1)	160 (21.4)	0.085	0.65 (0.39; 1.07)	<i>wArgG</i> /любой*	30	189	0.238	0.73 (0.44–1.23)
<i>dupArgG</i>	2 (1.4)	16 (2.1)	0.754	0.66 (0.15; 2.92)	<i>wArgA</i> /любой	0	21	0.061	1.19 (1.16–1.23)
<i>dupProA</i>	14 (10.0)	44 (5.9)	0.070	1.78 (0.95; 3.34)	<i>wProG</i> /любой	19	143	0.077	0.60 (0.34–1.06)
<i>wProA</i>	3 (2.1)	14 (1.9)	0.741	1.15 (0.33; 4.05)	<i>dupArgG</i> /любой	2	16	0.754	0.66 (0.15–2.92)
<i>dupProG</i>	1 (0.7)	31 (4.1)	0.051	0.17 (0.02; 1.23)	<i>dupProA</i> /любой	14	43	0.051	1.92 (0.99–3.75)
<i>dupArgA</i>	1 (0.7)	5 (0.7)	0.952	1.07 (0.12; 9.22)	<i>wProA</i> /любой	3	14	0.741	1.15 (0.33–4.05)
Всего	140 (100)	748 (100)			<i>dupProG</i> /любой	1	31	0.051	0.17 (0.02–1.23)
					<i>dupArgA</i> /любой	1	5	0.952	1.07 (0.12–9.22)

Примечание. Аллели в составе гаплотипа и диплотипа указаны в порядке rs17878362–rs1042522–rs1625895; * любой гаплотип, кроме *wArgG*.

диплотипа *TP53* в зависимости от гомозиготного или гетерозиготного состояния [17, 20–22].

В целом полученные в настоящей работе результаты близки результатам ранее проведенного анализа сцепления между rs17878362, rs1042522 и rs1625895, а также их тройных гаплотипов, при другом крайне агрессивном варианте В-НХЛ – диффузной В-крупноклеточной лимфоме [23, 24]. Это может быть свидетельством вовлеченности гаплотипной структуры данного гена в предопределение подверженности к развитию различных вариантов лимфом.

Работа выполнена в рамках бюджетной темы по государственному заданию № 0324-2018-0002.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Blomberg P.A., Wall M., Seymour J.F. The molecular pathogenesis of B-cell non-Hodgkin lymphoma // Eur. J. Haematol. 2015. V. 95. № 4. P. 280–293.
- VanValkenburg M.E., Pruitt G.I., Brill I.K. et al. Family history of hematologic malignancies and risk of multiple myeloma: differences by race and clinical features // Cancer Causes Control. 2016. № 27. P. 81–91.
- Воропаева Е.Н., Постеплова Т.И., Воевода М.И. и др. Ассоциация полиморфизма Arg399Gln гена репарации ДНК *XRCC1* с риском развития неходжкинских лимфом высокой степени злокачественности // Гематология и трансфузиология. 2013. Т. 58. № 1. С. 10–14.
- Березина О.В., Вайнер А.С., Воропаева Е.Н. и др. Влияние однонуклеотидных замен в генах фолатного цикла на риск развития агрессивных неходжкинских лимфом // Сиб. мед. обозрение. 2011. Т. 3. № 69. С. 22–26.
- Fan C., Wei J., Yuan C. et al. The functional *TP53* rs1042522 and *MDM4* rs4245739 genetic variants contribute to Non-Hodgkin lymphoma risk // PLoS One. 2014. V. 9. № 9. e107047.
- Vymetalkova V., Soucek P., Kunicka T. et al. Genotype and haplotype analyses of *TP53* gene in breast cancer patients: Association with risk and clinical outcomes // PLoS One. 2015. V. 10. № 7. e0134463.
- Трифонова Е.А., Спиридонова М.Г., Габидуллина Т.В. и др. Анализ структуры неравновесия по сцеплению и ассоциации полиморфных вариантов гена *MTHFR* с коронарным атеросклерозом // Генетика. 2012. Т. 48. № 10. С. 1207–1220.
- Воропаева Е.Н., Воевода М.И., Постеплова Т.И. и др. Инtronные полиморфизмы антионкогена *TP53* у пациентов старшей возрастной группы с индолентными вариантами неходжкинских злокачественных лимфом // Успехи геронтологии. 2013. Т. 26. № 2. С. 258–262.
- Perez-Losada J., Castellanos-Martin A., Mao J.H. Cancer evolution and individual susceptibility // Integr. Biol. (Camb.). 2011. V. 3. № 4. P. 316–328.
- Azzam G.A., Frank A.K., Hollstein M. et al. Tissue-specific apoptotic effects of the *p53* codon 72 polymorphism in a mouse model // Cell Cycle. 2011. V. 10. № 9. P. 1352–1355.

11. Wu X., Zhao H., Amos C.I. et al. P53 genotypes and haplotypes associated with lung cancer susceptibility and ethnicity // J. Nat. Cancer Inst. 2002. № 94. P. 681–690.
12. Škereňová M., Halašová E., Matáková T. et al. Low variability and stable frequency of common haplotypes of the *TP53* gene region in colorectal cancer patients in a slovak population // Anticancer Res. 2017. V. 37. № 4. P. 1901–1907.
13. Marcel V., Tran P.L., Sagne C. et al. G-quadruplex structures in *TP53* intron 3: role in alternative splicing and in production of p53 mRNA isoforms // Carcinogenesis. 2011. V. 32. № 3. P. 271–278.
14. Weng Y., Lu L., Yuan G. et al. P53 codon 72 polymorphism and hematological cancer risk: an update meta-analysis // PLoS One. 2011. V. 7. № 9. e45820.
15. Поспелова Т.И., Воропаева Е.Н., Воевода М.И. и др. Полиморфизм гена *p53* как потенциальный маркер предрасположенности к развитию неходжкинских злокачественных лимфом // Гематология и трансфузиология. 2010. Т. 55. № 1. С. 11–17.
16. Cherdynseva N.V., Denisov E.V., Litviakov N.V. et al. Crosstalk between the *FGFR2* and *TP53* genes in breast cancer: data from an association study and epistatic interaction analysis // DNA Cell Biol. 2012. V. 31. № 3. P. 306–316.
17. Сметанникова Н.А., Максимов В.Н., Устинов С.Н. и др. Генотипы и гаплотипы гена-онкосупрессора *p53*: ассоциация с продолжительностью жизни у русских Новосибирской области // Сиб. онкол. журн. 2006. Т. 2. № 18. Р. 37–41.
18. Conrad D.F., Jakobsson M., Coop G. et al. A worldwide survey of haplotype variation and linkage disequilibrium in the human genome // Nat. Genet. 2006. № 38. P. 1251–1260.
19. Khrunin A.V., Tarskaia L.A., Spitsyn V.A. et al. P53 polymorphisms in Russia and Belarus: correlation of the 2-1-1 haplotype frequency with longitude // Mol. Genet. Genomics. 2005. V. 272. № 6. P. 666–672.
20. Hsieh L.L., Huang T.H., Chen I.H. et al. P53 polymorphisms associated with mutations in and loss of heterozygosity of the *p53* gene in male oral squamous cell carcinomas in Taiwan // Br. J. Cancer. 2005. V. 92. № 1. P. 30–35.
21. Mitra S., Misra C., Singh R.K. et al. Association of specific genotype and haplotype of *p53* gene with cervical cancer in India // J. Clin. Pathol. 2005. V. 58. № 1. P. 26–31.
22. Mitra S., Sikdar N., Misra C. et al. Risk assessment of *p53* genotypes and haplotypes in tobacco-associated leukoplakia and oral cancer patients from eastern India // Int. J. Cancer. 2005. V. 117. № 5. P. 786–793.
23. Voropaeva E.N., Voevoda M.I., Maksimov V.N. et al. Linkage disequilibrium and haplotypes of the rs1042522, rs1625895, and rs1787862 markers of *TP53* in patients with diffuse large b-cell lymphoma // Mol. Biology. 2014. V. 48. № 5. P. 664–670.
24. Воропаева Е.Н., Поспелова Т.И., Воевода М.И. Ген *TP53* при диффузной В-крупноклеточной лимфоме. Новосибирск: Наука, 2018. 164 с.

Triple Haplotypes the *TP53* Gene in Patients with Diffuse Small B-Cell Lymphoma

E. N. Voropaeva^{a,*}, N. V. Cherdynseva^b, M. I. Voevoda^{a, e},
T. I. Pospelova^c, V. N. Maximov^{a, e}, Yu. L. Orlov^{d, e}, and T. A. Ageeva^c

^aThe Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Research Institute of Internal and Preventive Medicine, Novosibirsk, 630089 Russia

^bTomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Oncology Research Institute of the Federal State Budgetary Institution, Tomsk, 634009 Russia

^cNovosibirsk State Medical University of Russian Ministry of Health, Novosibirsk, 630091 Russia

^dSechenov First Moscow State Medical University, Moscow, 119991 Russia

^eNovosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia

*e-mail: vena.81@mail.ru

The role of genetic susceptibility to the lymphomas development is confirmed by the accumulating data on common genetic variants of the genes involved in lymphomagenesis. A variety of disease variants, as well as the small effect of each of the polymorphisms, require the analysis of these markers in individual histological lymphoma subtypes and in haplotype groups. The purpose of this study is to analyze the frequencies of rs1042522, rs1625895 and rs17878362, their triple haplotypes and linkage disequilibrium in patients with diffuse small B-cell lymphoma and in the control group. The absence of marked linkage disequilibrium between the rs17878362, rs1042522 and rs1625895 *TP53* gene in the population control sample was revealed. At the same time, data on significant linkage disequilibrium between rs1625895 and rs1042522, as well as rs1625895 and rs17878362, and on moderate linkage disequilibrium between rs17878362 and rs1042522 in the group of patients with lymphoma were obtained. An association of the haplotype *wArgG* in the homozygous state with a predisposition to the development of diffuse B-small cell lymphoma was found.

Keywords: *TP53* gene, haplotype structure, developmental risk, non-Hodgkin lymphomas, linkage disequilibrium, rs17878362, rs1042522, rs1625895.