

На правах рукописи

ДЕНИСОВ
Евгений Владимирович

МУТАЦИОННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ГЕНА *TP53*
ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

03.02.07 – генетика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Томск – 2010

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении Высшего профессионального образования “Томский государственный университет” и в Учреждении Российской академии медицинских наук Научно-исследовательском институте онкологии Сибирского отделения РАМН, г. Томск

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор
Стегний Владимир Николаевич

доктор биологических наук, профессор
Чердынцева Надежда Викторовна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор
Суханова Галина Алексеевна

доктор медицинских наук
Любченко Людмила Николаевна

Ведущая организация:

Медико-генетический научный центр
РАМН, г. Москва

Защита состоится «_____» _____ 2010 года в _____ час. _____ мин.
на заседании объединенного диссертационного совета ДМ 001.045.01 при
Учреждении Российской академии медицинских наук НИИ медицинской ге-
нетики СО РАМН по адресу: 634050, г. Томск, ул. Набережная р. Ушайки,
д. 10

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской
академии медицинских наук НИИ медицинской генетики СО РАМН

Автореферат разослан «_____» _____ 2010 года

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук

Кучер А.Н.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Рак молочной железы (РМЖ) занимает лидирующие позиции по заболеваемости злокачественными новообразованиями среди женщин, каждая 12-я имеет риск заболеть в течение жизни, смертность составляет 25-40% (Washbrook, 2006; Комарова, 2008; Давыдов, Аксель, 2009; Чиссов, 2009). Генетическая детерминация, обусловленная наследственными нарушениями в высокопенетрантных генах, детектируется лишь в 5-8% случаев РМЖ (Карпухин и др., 2002; Любченко и др., 2007; Bradbury, Olopade, 2007; Коваленко и др., 2008; Foulkes, 2008). Этиология, генетические факторы и молекулярные механизмы спорадического РМЖ до сих пор остаются не до конца изученными (Имянитов, Хансон, 2004; Friedrich et al., 2008). Злокачественная трансформация клеток и опухолевая прогрессия, проявляющаяся клинически инвазией, регионарным и отдаленным метастазированием, связаны с нарушениями нормального функционирования генома и, как следствие, с высокой генетической нестабильностью под влиянием эндогенных и экзогенных канцерогенных факторов, действие которых существенно модифицируется разной индивидуальной генетической предрасположенностью к заболеванию (Egger et al., 2004; Sprague et al., 2007; Копнин, 2007; Заридзе, 2008; Блохин, 2009). Молекулярный патогенез РМЖ, как и многих других онкологических заболеваний, включает множество генетических и эпигенетических событий, ведущих к активации онкогенов и инактивации генов опухолевой супрессии, лежащих в основе опухолевой трансформации (Ляхович и др., 2004; Payne, Kemp, 2005; Croce, 2008; Залетаев, 2008; Лихтенштейн, 2009).

Ген *TP53* является одним из ключевых генов-супрессоров опухолевого роста, функция которого направлена на ограничение вероятности возникновения генетически нестабильных клеток. Белок p53 осуществляет регуляцию широкого спектра клеточных процессов, выступая своего рода “молекулярным полисменом”, ведущим постоянный надзор за состоянием генома и устраняющим потенциально опасные в плане злокачественной трансформации клетки (Phillips, 1999; Чумаков и др., 2007; Vousden, Lane, 2007; Копнин, 2008). В человеческих популяциях активность белка p53 в значительной степени модифицирована генетическим полиморфизмом, наиболее значимым является точечная замена гуанина на цитозин в 72-м кодоне 4-го экзона (Ex4+119G>C, Arg72Pro, rs1042522), при этом G и C аллели кодируют различающиеся по биохимическим и физиологическим свойствам белки, обладающие разной эффективностью в поддержании генетического гомеостаза клетки в условиях влияния генотоксических факторов. Полиморфизм в 6-м интроне (IVS6+62G>A, rs1625895), а также инсерция/делеция 16 п.н. в 3-м интроне (INDEL, IVS3+41ins16bp, rs17878362) могут существенно изменять «дозу» гена, тем самым влияя на активность белка p53 (Whibley et al., 2009). По данным последних мета-анализов не обнаружено ассоциации формирования РМЖ с тем или иным генотипом (аллелем) по Ex4+119G>C и IVS6+62G>A полиморфизму гена *TP53*, тогда как инсерция 16 п.н. (IVS3+41ins16bp) играла роль в развитии данного заболевания (Hu et al.,

2010; Ma et al., 2010). При этом в литературе имеются довольно противоречивые данные о связи определенных генотипов (Ex4+119G>C) с прогрессией РМЖ (Tommiska et al., 2005; Xu et al., 2005; Чердынцева и др., 2006; Damin et al., 2006; Toyama et al., 2007; Costa et al., 2008; Xu et al., 2008; Hrstka et al., 2009). Недостаточная информативность мета-анализов и неоднозначность результатов при оценке ассоциации полиморфизма *TP53* с патогенетическими признаками заболевания могут быть обусловлены недоучетом статуса p53 собственно в опухолевых клетках, поскольку именно его нарушения в виде соматических мутаций, эпигенетических модификаций, аллельного дисбаланса (потеря гетерозиготности) лежат в основе злокачественной трансформации. Генетические изменения, приводящие к дисфункции опухолевых супрессоров, часто происходят в результате классического «двухударного» механизма: соматические мутации либо метилирование в одном аллеле и утрата другого (Knudson, 1971, 2001). Ген *TP53*, как наиболее транскрипционно активный, чья экспрессия индуцируется многими стрессорными стимулами, является высокочувствительной мишенью мутагенеза. При РМЖ до 50% опухолей содержат мутации в гене *TP53*, приводящие к частичной либо полной потере функциональности белка, и, более того, часто способствующие приобретению им онкогенных свойств. Такие различия в «функциональной значимости» мутаций, по-видимому, не позволяют получить однозначных результатов об их связи с проявлениями опухолевой прогрессии (Feki, Irminger-Finger, 2004; Petitjean et al., 2007; Brosh, Rotter, 2009). В литературе также есть немногочисленные указания, что метилирование гена *TP53* при РМЖ может выступать в качестве альтернативного механизма инактивации белка p53 и ассоциировано с инвазивностью опухолевого процесса (Kang et al., 2001). Недавно в опухолевой ткани гетерозиготных по Ex4+119G>C полиморфизму больных РМЖ был показан феномен потери определенных аллелей гена *TP53* (Bonafe et al., 2003; Kyndi et al., 2006). Более того, авторы выявили ассоциацию утраты аллелей с показателями выживаемости пациентов, однако плохой прогноз в этих исследованиях был связан с потерей разных аллелей. Неоднозначность полученных этими авторами данных указывает на важность продолжения исследований. Соматические мутации в гене *TP53*, метилирование и утрата аллелей могут обуславливать «двухударную» инактивацию гена *TP53*, которая вносит вклад в формирование и прогрессию РМЖ. Все вышесказанное указывает на актуальность исследований, учитывающих все возможные варианты изменений в гене *TP53*, которые могут определять потенциальные механизмы его участия в опухолевой прогрессии РМЖ.

Цель исследования: Изучить мутационную изменчивость гена *TP53*, обусловленную генетическими вариациями, эпигенетическими модификациями, потерей гетерозиготности и соматическими мутациями у больных раком молочной железы, и ее связь с патогенетически значимыми признаками заболевания.

Задачи исследования:

1. Оценить распределение генотипов по полиморфным вариантам гена *TP53* в лейкоцитах периферической крови и в опухолевой ткани больных раком молочной железы.
2. Оценить потерю гетерозиготности на высоко вариабельных участках в локусе гена *TP53* у гетерозиготных больных раком молочной железы с утратой аллелей в опухолевой ткани.
3. Провести анализ генетических и эпигенетических нарушений гена *TP53* у больных раком молочной железы с утратой одного и сохранением другого аллелей в опухоли.
4. Провести анализ связи мутаций и генотипов по полиморфным вариантам гена *TP53* у больных раком молочной железы с патогенетическими характеристиками опухолевого процесса, отражающими проявления опухолевой прогрессии.

Научная новизна исследования:

Впервые у больных раком молочной железы охарактеризован в сравнительном аспекте полиморфизм гена *TP53* (Ex4+119G>C, IVS3+41ins16bp, IVS6+62G>A) в лейкоцитах периферической крови и в опухоли. Показано, что в опухоли гетерозиготных по Ex4+119G>C полиморфизму больных раком молочной железы утрата одного аллеля обусловлена делецией участка гена *TP53*, а инактивация другого – соматическими мутациями, что согласуется с двухударной концепцией канцерогенеза А. Кнудсона. Впервые на территории РФ выявлены новые мутации в гене *TP53* у больных раком молочной железы: три в интронных областях – с.376-57A>C, с.673-20G>C, с.919+26_с.919+27ins1 и одна в 7-м экзоне – с.697_699del3, не представленные в базе IARC *TP53* Mutation Database R14. Показано, что у больных, носителей аллельного варианта C по Ex4+119G>C полиморфизму гена *TP53*, реже отмечаются проявления опухолевой прогрессии по сравнению с пациентками, несущими G аллель. Наличие мутаций в полиморфных сайтах гена *TP53*, приводящих к несоответствию генотипов в лейкоцитах периферической крови и в опухолевой ткани больных РМЖ, ассоциировано с экспрессией рецепторов к эстрогенам и прогестерону на опухолевых клетках.

Теоретическая и практическая значимость:

Полученные в данном исследовании результаты расширяют представления о молекулярно-генетических механизмах прогрессии рака молочной железы, в частности, о вкладе полиморфизма гена *TP53* в развитие рака данной локализации. Одновременная оценка полиморфизма и соматического статуса гена *TP53* может быть использована как оригинальный дополнительный методологический подход для проведения исследований по изучению патогенеза злокачественных новообразований других локализаций. На основании результатов анализа связи молекулярно-генетических изменений гена *TP53* в опухоли с патогенетическими характеристиками злокачественного процесса могут быть разработаны дополнительные критерии оценки прогноза клинического течения рака молочной железы, которые совместно со стандартными

позволят повысить информативность прогноза и оптимизировать тактику лечения, и, как следствие, увеличить эффективность терапии и качество жизни больных раком молочной железы. Новые сведения могут быть использованы в образовательном процессе при подготовке специалистов естественнонаучного профиля.

Положения, выносимые на защиту:

1. Нарушения гена *TP53* в опухоли гетерозиготных больных раком молочной железы могут происходить по принципу концепции двухударной инактивации А. Кнудсона, когда один аллель содержит мутацию, а другой делетирован.
2. Сравнительный анализ полиморфизма гена *TP53* в лейкоцитах периферической крови и в опухолевой ткани может быть использован как дополнительный метод поиска инактивирующих событий данного гена при раке молочной железы.
3. Одновременная оценка полиморфизма и соматического статуса гена *TP53* у больных раком молочной железы объективизирует представления о механизмах участия данного гена в прогрессии рака молочной железы.

Апробация работы: Материалы диссертационной работы были представлены на: 54-57-й научных студенческих конференциях биолого-почвенного факультета (Биологического института) Томского государственного университета “Старт в науку” (Томск, 2004-2008); XLIII-XLV международных научных студенческих конференциях “Студент и научно-технический прогресс” (Новосибирск, 2005-2007); I Российско-американской конференции “Биотехнология и онкология” (Санкт-Петербург, 2005); Научно-практической конференции “Достижения современной генетики”, посвященной 70-летию Новосибирской Государственной Медицинской Академии (Новосибирск, 2005); X Всероссийском научном форуме с международным участием имени академика В.И. Иоффе “Дни иммунологии в Санкт-Петербурге” (Санкт-Петербург, 2006); Всероссийской конференции по фундаментальной онкологии “Петровские чтения – 2006, 2008” (Санкт-Петербург, 2006, 2008); XIV международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2007» (Москва, 2007); II-IV региональных конференциях молодых ученых имени академика РАМН Н.В. Васильева “Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии” (Томск, 2007-2009); III международной конференции “Фундаментальные науки медицине” (Новосибирск, 2007); 5-й международной конференции по раку молочной железы “Сердце, душа и наука: это всего лишь маленький мир” (Виннипег, Канада, 2008); Российской научно-практической конференции с международным участием “Современные аспекты диагностики и лечения рака молочной железы” (Томск, 2008); Всероссийской конференции с международным участием “Молекулярная онкология” (Новосибирск, 2008); 13-й Зимней школе “Роль биомолекул в норме и при патологии” (Хельсинки, Финляндия, 2009); Международной конференции по раку молочной железы

(Брюссель, Бельгия, 2009); Сибирско-Тайваньском форуме “Опыт научно-технического и инновационного сотрудничества Томской области и Тайваня” (Томск, 2009).

Публикации: По теме диссертации опубликовано 34 печатных работы, в том числе 4 статьи в журналах Перечня ведущих рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата биологических наук.

Структура и объем диссертации: Диссертационная работа изложена на 133 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, собственных результатов и их обсуждения, заключения и выводов. Данные проиллюстрированы 14 таблицами, 16 рисунками. Библиографический список включает 223 источника, из них 30 работ отечественных авторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве материала исследования использовали образцы опухолевой ткани ($n=80$) и лейкоцитов периферической крови ($n=80$) больных sporadическим РМЖ в возрасте от 29 до 76 лет (средний возраст $51,7 \pm 1,6$), получавших комбинированное лечение в клинике НИИ Онкологии СО РАМН в 2004-2008 годах. Диагноз был подтвержден морфологически. В исследование включены больные с операбельной формой РМЖ стадии $T_{1-4}N_{0-2}M_0$. Работа проводилась с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан» (Указ Президента РФ от 24.12.1993 № 2288). Было получено разрешение этического комитета НИИ Онкологии СО РАМН. Материалом для исследования послужила ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической крови и опухолевой ткани больных РМЖ. В качестве негативного и позитивного контролей при секвенировании нуклеотидной последовательности гена *TP53* на участках 5, 7 и 8-го экзонов использовали ДНК опухолевых линий с заведомо известным статусом, любезно предоставленных профессором П.М. Чумаковым (Научно-исследовательский институт Лернера, Кливленд, США).

В ходе работы были изучены 3 полиморфных варианта гена *TP53*, мини- и микросателлитные участки в гене *TP53* (VNTR) и в локусе 17p13.1 (D17S796), метилирование промоторной области и 4-го экзона гена *TP53*, соматические мутации на участках 5, 7 и 8-го экзонов и в прилежащих к ним интронных областях гена *TP53*. В исследовании использована полимеразная цепная реакция и анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов, метил-специфическая полимеразная цепная реакция, секвенирование (табл. 1).

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета прикладных программ «STATISTICA 6.0» (StatSoft Inc., США), Fisher's exact test (Khan, 2003). Для проверки гипотезы о значимости различий между исследуемыми группами использовали критерий согласия χ^2 , определяемый

Таблица 1 - Последовательности праймеров, используемые в данной работе

Регион	Праймеры	п.н.	Ta	Ссылка
3-й интрон (IVS3+41ins16bp)	F5'-TGGGACTGACTTTTCTGCTCTT-3' R5'-TCAAATCATCCATTGCTTGG-3'	180 196	57°C	(Wu et al., 2002)
6-й интрон (IVS6+62G>A)	F5'-TGGCCATCTACAAGCAGTCA-3' R5'-TTGCACATCTCATGGGGTTA-3'	404	57°C	(Wu et al., 2002)
4-й экзон (Ex4+119G>C)	F5'-TTGCCGTCCCAAGCAATGGATGA-3' R5'-TCTGGGAAGGGACAGAAGATGAC-3'	199	63°C	(Ara et al., 1990)
VNTR (1-й интрон гена <i>TP53</i>)	F5'-ACTCCAGCCTGGGCAATAAGAGCT-3' R5'-ACAAAACATCCCCTACCAAACAGC-3'	131	64°C	(Hahn et al., 1993)
D17S796	F5'-CAATGGAACCAAATGTGGTC-3' R5'-AGTCCGATAATGCCAGGATG-3'	144- 174	63°C	(Grebe et al., 1997)
Промотор (CG повторы)	Mt F5'-CGTCGTATTTTCGGATTAGATTTTC-3' Mt R5'-AAAAAAACGTAAACGCTTCTCGC-3'	166	55°C	(Almeida et al., 2009)
	UnMt F5'-GGTTGTTGTATTTTGGATTAGATTTT-3' UnMt R5'-AAAAAAACATAAACACTTCTCACC-3'	170		
4-й экзон (CG повторы)	F5'-GTCGTTTTTAAGTAATGGATG-3' R5'-AACAACTAACCGTACAAATCAC-3'	281	53°C	собственный дизайн
5-й экзон	F5'-GCCGTCTTCCAGTTGCTTTATC-3' R5'-GCCAGACCTAAGAGCAATCAGTG-3'	344	63°C	
7-й экзон	F5'-GGAGAATGGCGTGAACCTGG-3' R5'-GGAAGAAATCGGTAAGAGGTGGG-3'	383		
8-й экзон	F5'-GAATCTCCTTACTGCTCCCACTC-3' R5'-GTCTCCTCCACCGCTTCTTG-3'	380		

Примечания: F – прямой праймер; R – обратный праймер; Mt, UnMt – праймеры на метилированную и неметилированную последовательности; Ta – температура отжига.

в четырехпольных таблицах (при значении абсолютных частот в анализируемых ячейках больше 10). В том случае, если значение таковых было меньше 10 и 5, использовали критерий χ^2 с поправкой Йетса и точный критерий Фишера (Φ), соответственно. Файлы секвенирования ДНК обрабатывали с помощью пакета прикладных программ DNADynamo (Blue Tractor Software Ltd., Великобритания). В качестве референсной последовательности использовали вариант гена *TP53* (NC_000017.9), полученный из базы данных Национального института биотехнологии (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Информацию об известных на настоящий момент мутациях в гене *TP53* получали из соответствующей базы данных (IARC *TP53* Mutation Database R14) (Petitjean et al., 2007). При анализе мутаций использована номенклатура (версия октябрь 2007 г.) описания генетических вариаций (den Dunnen, Antonarakis, 2000).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Распределение генотипов по полиморфизму гена *TP53* (Ex4+119G>C, IVS6+62G>A и IVS3+41ins16bp) у больных РМЖ в крови и опухолевой ткани

В опухолевой ткани больных РМЖ по сравнению с лейкоцитами периферической крови нами отмечена тенденция к уменьшению частоты гетерозиготного генотипа по Ex4+119G>C полиморфизму ($p=0,09$; табл. 2).

Таблица 2 – Распределение генотипов гена *TP53* (полиморфизм Ex4+119G>C, IVS3+41ins16bp и IVS6+62G>A) у больных РМЖ в лейкоцитах крови и в опухолевой ткани

Генотипы		Парные образцы крови и опухоли РМЖ (n=80)				p*
		лейкоциты крови		опухоль		
		N	%	N	%	
Ex4+119G>C	G/G	42	52,5	39	48,8	0,63
	G/C	32	40,0	22	27,5	0,09
	C/C	6	7,5	6	7,5	1,00
	G/-	-	-	11	13,7	-
	-/C	-	-	2	2,5	-
IVS3+41ins16bp	w/w	65	81,3	61	76,3	0,43
	w/16bp	14	17,5	15	18,7	0,83
	16bp/16bp	1	1,2	2	2,5	0,56
	w/-	-	-	2	2,5	-
IVS6+62G>A	G/G	63	78,8	58	72,5	0,35
	G/A	16	20,0	21	26,3	0,34
	A/A	1	1,2	1	1,2	1,00

Примечания: * – уровень статистической значимости различий распределения генотипов между лейкоцитами периферической крови и опухолевой тканью; G/-, -/C и w/- – генотипы с утратой одного аллеля.

В 26,3% (21/80) случаев нами идентифицированы мутации в полиморфных сайтах гена *TP53* в опухолевой ткани больных РМЖ, приводящие к несоответствию генотипов в лейкоцитах периферической крови и в опухоли. Большая часть (66,7%; 14/21) таких мутаций обусловлена утратой одного аллеля у гетерозиготных пациенток, в частности, в 78,6% (11/14) потерей аллеля С по Ex4+119G>С полиморфизму (табл. 2, 3). Следует также отметить, что потеря аллелей гена *TP53* детектировались почти у половины (38,9%; 14/36) гетерозиготных носителей (Ex4+119G>С и IVS3+41ins16bp). В меньшем числе случаев (33,3%; 7/21) были обнаружены различные типы мутаций, представленные точечными заменами с.214G>С и с.672+62G>А либо инсерцией 16 п.н. в полиморфных сайтах гена *TP53* (Ex4+119G>С, IVS6+62G>А и IVS3+41ins16bp) (данные не представлены).

Таблица 3 – Мутации в полиморфных сайтах гена *TP53*, обнаруженные в опухолевой ткани больных раком молочной железы

Образец	Генотип: кровь → опухоль			LOH	
	Ex4+119G>C	IVS3+41ins16bp	IVS6+62G>A	VNTR	D17S796
1	G/C → G/-	-	-	-	+
2	G/C → G/-	-	-	-	+
3	G/C → G/-	-	-	+	+
4	G/C → G/-	-	-	+	+
5	G/C → G/-	-	-	-	-
6	G/C → G/-	-	-	+	+
7	G/C → G/-	-	-	+	+
8	G/C → G/-	-	-	+	+
9	G/C → G/-	w/16bp → w/-	-	+	+
10	G/C → G/-	-	-	+	-
11	G/C → G/-	w/w → w/16bp	G/G → G/A	+	+
12	G/C → C/-	-	-	-	+
13	G/C → C/-	-	-	-	-
14	-	w/16bp → w/-	-	-	+

Примечания: LOH – оценка потери гетерозиготности по мини- и микросателлитному локусам; “-” – отсутствие LOH на данном участке; “+” – наличие LOH.

Изучение потери гетерозиготности у больных РМЖ, носителей гетерозиготного генотипа гена *TP53* (Ex4+119G>С и IVS3+41ins16bp) с утратой аллелей в опухоли

Проведенный анализ мини- и микросателлитных локусов показал, что большинство гетерозиготных больных РМЖ (85,7%, 12/14), в опухоли которых отмечалась утрата одного аллеля, характеризуется аллельным дисбалансом на двух локусах, при этом на вариабельном участке 1-го интрона гена *TP53* LOH детектировалась в 57,1% (8/14) случаев (Рис. 1; табл. 3).

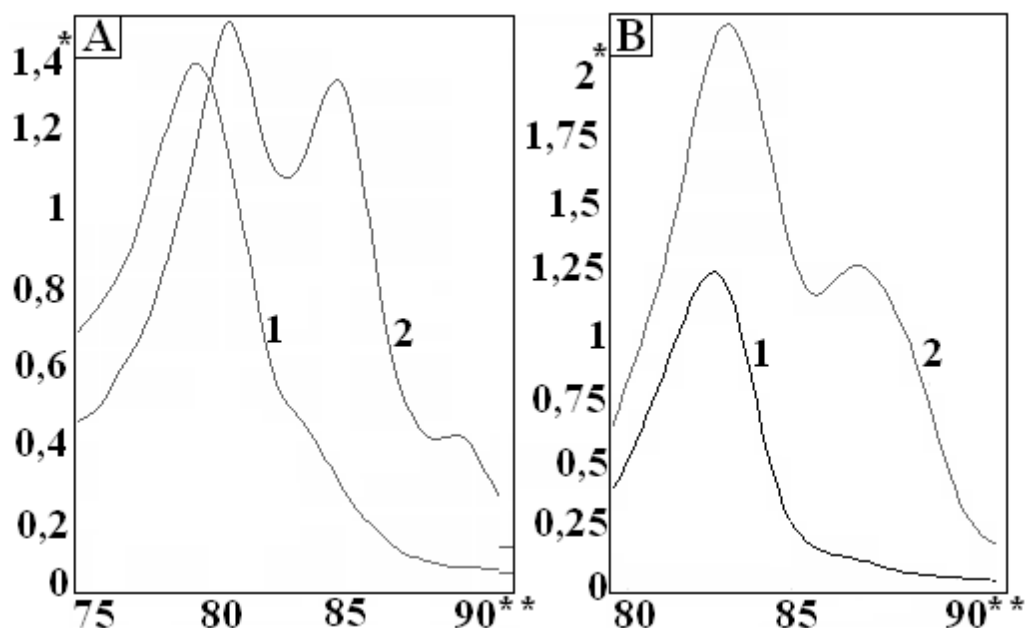


Рис. 1 – Пример анализа потери гетерозиготности по участкам VNTR в 1-м интроне гена *TP53* (A) и D17S796 (B). 1 – образец с LOH; 2 – образец без LOH; * – уровень флюоресценции; ** – температура плавления.

Изучение метилирования и соматических мутаций гена *TP53* у гетерозиготных больных РМЖ с потерей одного и сохранением другого аллелей

Метилирование CG пар в промоторной области ассоциировано с потерей генной экспрессии и прекращением образования белкового продукта (Agirre et al., 2003; Duffy et al., 2009). Кроме того, эпигенетические модификации экзонных областей могут отражаться на компактизации хроматина и снижении интенсивности репликации ДНК (Sharma et al., 2010). В соответствии с этим нами проведен анализ метилирования промотора, а также 4-го экзона гена *TP53* ввиду того, что большинство случаев делеции аллелей детектировалось у гетерозиготных по Ex4+119G>C полиморфизму больных РМЖ (табл. 3). Ни в одном из проанализированных нами опухолевых образцов не установлено метилирование CG пар промоторной области гена *TP53* (Рис. 2А). При анализе статуса метилирования CG повторов 4-го экзона гена *TP53* мы обнаружили, что ДНК лейкоцитов периферической крови здоровых людей, а также опухолевая ДНК пациенток с РМЖ содержали метилированные цитозины (Рис. 2Б). Данный факт весьма интересен, поскольку ранее высокий уровень (до 50%) метилирования 4-го экзона был отмечен в бластоцистах зародышей человека (Magdinier et al., 2002). В связи с этим авторами сделано предположение о значительной роли процесса метилирования гена *TP53* на участке 4-го экзона в предимплантационном развитии организма человека. Однако в настоящее время показано, что метилирование достаточно часто встречается и в отсутствии патологии, т.е. в норме (Zhang, Meaney, 2010).

При секвенировании 5, 7 и 8-го экзонов и прилежащих к ним интронных областей гена *TP53* (Рис. 2 В,Г) у больных РМЖ с соматическими мутациями данного гена чаще наблюдалась потеря аллеля С (Ex4+119G>C)

(табл. 4, табл. 5; точный критерий Фишера: односторонний $p=0,02$; двусторонний $p=0,03$).

Таблица 4 – Частота потери аллеля С (Ex4+119G>C) гена *TP53* у больных РМЖ с наличием либо отсутствием соматических мутаций в 5, 7 и 8-м экзонах и прилежащих к ним интронах

		Наличие мутаций гена <i>TP53</i>				p
		норма (n=19)		мутации (n=15)		
		N	%	N	%	
Потеря аллеля С	-	16	84,2	7	46,7	0,02*
	+	3	15,8	8	53,3	0,03**

Примечания: “-”, “+” – отсутствие/наличие потери аллеля С. В таблице приведен уровень статистической значимости точного одностороннего (*) и двустороннего (**) критерия Фишера.

Таблица 5 – Соматические мутации гена *TP53*, обнаруженные у больных РМЖ

Участок	Позиция в кДНК и первичной структуре белка p53	Частота в IARC <i>TP53</i> Mutation Database R14	Тип мутации
Интрон			
4	c.376-57A>C	*	интронная
6	c.673-20G>C	*	интронная
7	c.782+18A>T	**	интронная
8	c.919+26_c.919+27ins1	*	интронная
Экзон			
5	c.390C>T, p.Leu130Leu	0,14	сайленс
5	c.466C>T, p.Arg156Cys	1,24	миссенс
5	c.488A>G, p.Tyr163Cys	0,17	миссенс
5	c.501G>C, p.Gln167His	0,04	миссенс
5	c.538G>A, p.Glu180Lys	0,14	миссенс
5	c.541C>T, p.Arg181Cys	1,28	миссенс
5	c.557A>G, p.Asp186Gly	0,09	миссенс
7	c.697_699del3	*	фреймшифт
7	c.697C>T, p.His233Tyr	0,07	миссенс
7	c.743G>A, p.Arg248Gln	1,24	миссенс
7	c.762C>T, p.Ile254Ile	0,14	сайленс
8	c.827C>A, p.Ala276Asp	0,04	миссенс
8	c.856G>A, p.Glu286Lys	0,23	миссенс

Примечания: * – новые мутации в гене *TP53*, ранее не представленные в IARC *TP53* Mutation Database R14; ** – частота мутации не приведена в IARC *TP53* Mutation Database R14.

Проведенный анализ соматических мутаций в гене *TP53* у больных РМЖ позволил получить приоритетные сведения, поскольку в настоящее время данный тип нарушений в опухолях молочной железы на территории Российской Федерации охарактеризован плохо. В текущей версии IARC *TP53* Mutation Database R14 информация о мутациях гена *TP53* при РМЖ в РФ не представлена совсем (Petitjean et al., 2007). Однако, в 2008-м году группой российских исследователей охарактеризован спектр соматических мутаций у российских женщин с уни- и билатеральным РМЖ (Suspitsin et al., 2008). В нашем исследовании большинство мутаций ранее были обнаружены при РМЖ другими авторами (табл. 5), однако одна – с.501G>C – идентифицирована при данном заболевании впервые. Четыре мутации (три в интронных областях – с.376-57A>C, с.673-20G>C, с.919+26_с.919+27ins1 и одна в 7-м экзоне – с.697_699del3) обнаружены нами впервые (данные нарушения не представлены в IARC *TP53* Mutation Database R14).

Двухударная модель инактивации гена *TP53* при раке молочной железы

Учитывая вышеприведенные результаты, можно заключить, что инактивация гена *TP53* при РМЖ происходит в рамках двухударной концепции А. Кнудсона, когда один аллель содержит мутацию, а второй делетирован. В большинстве случаев мы наблюдаем данную закономерность для гетерозиготных по Ex4+119G>C полиморфизму больных РМЖ, при этом функциональная дифференциация между аллелями может определять инактивирующие события в гене *TP53* (Рис. 3). В частности, аллельный вариант С, белок p53Pro которого является ярко выраженной трансактивационной и репарационной молекулой, преимущественно утрачивается посредством делеции (потеря гетерозиготности), а аллель G, кодирующий более слабый в плане защиты от стрессорных воздействий белок p53Arg, инактивируется точечными мутациями в 5, 7 и 8-м экзонах гена *TP53*.

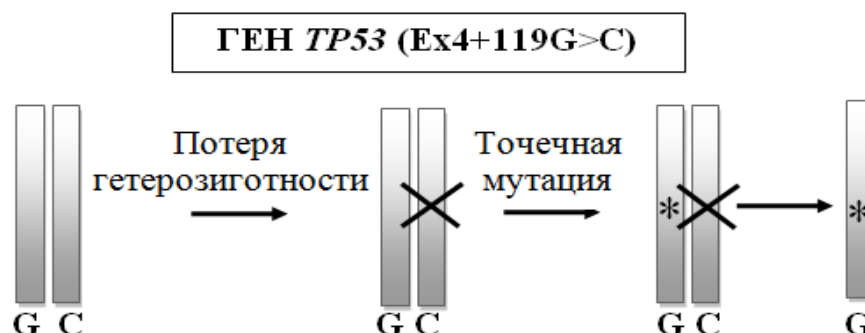


Рис. 3 – Двухударная модель инактивации гена-супрессора опухолевого роста *TP53* при раке молочной железы. Рассмотрен пример инактивации гена *TP53* у гетерозиготных по Ex4+119G>C полиморфизму больных РМЖ.

Полиморфизм гена *TP53* (Ex4+119G>C, IVS6+62G>A и IVS3+41ins16bp) и клиническое течение рака молочной железы

Были изучены частоты различных генотипов и аллелей гена *TP53* у больных РМЖ с различными патогенетическими характеристиками злокачественного процесса. Отмечено, что у больных РМЖ с генотипом С/С (Ex4+119G>C) по сравнению с пациентками с G/G и G/C чаще наблюдался клинически более благоприятный локализованный процесс заболевания (83,3% против 35,7% и 34,4%, соответственно; точный критерий Фишера: односторонний $p=0,03$; двусторонний $p=0,06$). Кроме того, у женщин с генотипом С/С отмечался только уницентрический характер роста опухоли, тогда как почти у четверти носителей G/G генотипа обнаружены мультифокальные опухоли, более агрессивные по своей природе (табл. 6). Следует отметить, что и носителей аллеля С было вдвое больше в группе больных с уницентрическими опухолями, чем среди больных с мультицентрическим ростом (данные не представлены). Также установлено, что у больных РМЖ с наличием экспрессии рецепторов к эстрогенам и прогестерону на опухолевых клетках по сравнению с пациентками с рецептор-негативными опухолями чаще встречаются обнаруженные нами мутации в полиморфных сайтах гена *TP53* (данные не представлены).

Таблица 6 – Частота уницентрического (УЦ) и мультицентрического (МЦ) РМЖ, отсутствие (N_0) и наличие (N_{1-2}) локорегионарного метастазирования у больных с генотипами по полиморфизму Ex4+119G>C гена *TP53*.

Генотипы (Ex4+119G>C)		G/G		G/C		C/C	
		N	%	N	%	N	%
Характер опухолевого роста	УЦ	28	75,7	22	81,5	6	100,0
	МЦ	9	24,3	5	18,5	0	0,0
p		0,80*				-	
Лимфогенное метастазирование	N_0	15	35,7	11	34,4	5	83,3
	N_{1-2}	27	64,3	21	65,6	1	16,7
p		0,90*				0,03** 0,06***	

Примечания: * – уровень статистической значимости различий между больными РМЖ с генотипами G/G и G/C; **, *** – уровень статистической значимости точного одностороннего и двустороннего критерия Фишера, соответственно, показывающий различия между группами больных РМЖ с генотипами G/G и C/C, G/C и C/C.

Заключение

В данной работе проведено изучение полиморфизма гена *TP53* (Ex4+119G>C, IVS6+62G>A и IVS3+41ins16bp) в лейкоцитах периферической крови и в опухоли больных РМЖ, выявлены основные события, приводящие к инактивации p53 в опухоли по принципу двухударного механизма. Осуществлена оценка влияния полиморфных вариантов и мутаций гена *TP53*

на клиническое течение РМЖ посредством выявления связи с различными проявлениями опухолевой прогрессии.

РМЖ характеризуется чрезвычайной вариабельностью течения злокачественного процесса, молекулярные механизмы которого во многом остаются неясными. Нарушения в гене *TP53*, который осуществляет регуляцию генов, вовлеченных в опухолевую прогрессию, могут вносить вклад в клиническое течение РМЖ. По нашим результатам больные РМЖ, носители генотипа С/С (Ex4+119G>C полиморфизм), чаще характеризуются менее агрессивным уницентрическим ростом опухоли и низкой склонностью к лимфогенному метастазированию, что может обеспечивать благоприятный прогноз заболевания для данной категории больных РМЖ. Показанная закономерность косвенно подтверждается данными о пониженном риске регионарного метастазирования у пациенток с уницентрическим РМЖ (Керимов, 2006; Вторушин, 2007). Механизм вклада Ex4+119G>C полиморфизма гена *TP53* в указанные проявления опухолевой прогрессии может объясняться высоким транскрипционным потенциалом белка p53Pro, кодируемого аллелем С, в отношении индукции транскрипции антиметастатических генов и генов, ответственных за характер опухолевого роста и другие клинические формы прогрессии РМЖ (Mashimo et al., 1998; Zou et al., 2000; van Golen, 2003; Stein et al., 2004; Bertucci et al., 2005; Van Laere et al., 2005; Wallden et al., 2005; Janicke et al., 2008).

В 26,3% (21/80) случаев у больных РМЖ в опухолевой ткани показаны мутации в полиморфных сайтах (Ex4+119G>C, IVS6+62G>A и IVS3+41ins16bp) гена *TP53*, обусловленные в большинстве своем (66,7%; 14/21) утратой одного аллеля у гетерозиготных пациенток, среди них в 78,6% (11/14) случаев отмечена потеря аллеля С по Ex4+119G>C полиморфизму. Следует отметить, что утрата аллелей гена *TP53* детектировались почти у половины (38,9%; 14/36) гетерозиготных носителей. Мы показали, что основным механизмом, приводящим к потере аллелей, в частности, аллеля С, является делеция участка гена *TP53*. Кроме того, потеря аллеля С и, соответственно, сохранение аллеля G, чаще встречаются у больных с соматическими мутациями гена *TP53* на участках 5, 7 и 8-го экзонов и прилежащих к ним интронах. Среди идентифицированных соматических мутаций гена *TP53* четыре (три в интронных областях – с.376-57A>C, с.673-20G>C, с.919+26_с.919+27ins1 и одна в 7-м экзоне – с.697_699del3) обнаружены впервые, т.к. они не представлены в базе IARC *TP53* Mutation Database R14 (Petitjean et al., 2007). Закономерность сочетания делеций, приводящих к потере аллеля С, и высокой частоты соматических мутаций, инактивирующих аллель G, позволяет нам рассмотреть данный феномен как подтверждение двухударной инактивации гена *TP53* в течении развития РМЖ (концепция А. Кнудсона). В клиническом ракурсе формирование мутаций в полиморфных сайтах гена *TP53* ассоциировано с экспрессией рецепторов к эстрогенам и прогестерону. Механизм ассоциации, вероятно, заключается в наличии не-

посредственного генотоксического воздействия метаболитов эстрогенов на ген *TP53* (Joosten et al., 2004; Zoon et al., 2009).

Литературные сведения о наличии высокого транскрипционного и репарационного потенциала для кодируемого белка p53Pro (Thomas et al., 1999; Pim, Banks, 2004; Siddique, Sabapathy, 2006) наряду с нашими данными о связи кодирующего белок p53Pro аллеля С (Ex4+119G>C) с более благоприятным клиническим течением РМЖ и высокой частоте его потери в опухоли молочной железы, вероятно, придающей опухолевым клеткам селективное преимущество в росте, позволяют характеризовать данную молекулу p53 как наиболее биологически активную по сравнению с p53Arg в плане проявления протективных свойств в отношении прогрессии РМЖ. Таким образом, на основании этого, а также учитывая ранее показанную в другом исследовании связь утраты аллеля С в опухолевой ткани с низкой безрецидивной и общей выживаемостью (Bonafe et al., 2003), мы можем рекомендовать анализ Ex4+119G>C полиморфизма гена *TP53* и его соматического статуса в опухоли как дополнительный метод оценки злокачественности клинического течения в плане прогноза заболевания.

Полученные в исследовании результаты расширяют представления о вкладе гена *TP53* в патогенез рака молочной железы. Данные о связи аллелей и мутаций гена *TP53* с клиническими проявлениями опухолевой прогрессии могут служить основой для разработки дополнительных прогностических критериев заболевания.

ВЫВОДЫ

1. В 26,3% случаев у больных раком молочной железы в опухолевой ткани отмечены мутации в полиморфных сайтах (Ex4+119G>C, IVS6+62G>A и IVS3+41ins16bp) гена *TP53*, в большинстве своем (66,7%) обусловленные утратой одного аллеля у гетерозиготных пациенток в 40,0% случаев, при этом в 78,6% выявлена потеря аллеля С (Ex4+119G>C).
2. У больных раком молочной железы, носителей гетерозиготного генотипа (Ex4+119G>C), утрата одного из аллелей в опухоли объясняется делецией участка гена *TP53*, что подтверждается высоким уровнем (85,7%) потери гетерозиготности в локусе VNTR 1-го интрона гена *TP53* и на участке хромосомы 17p13.1 (локус D17S796) у данной категории пациенток.
3. У пациенток с раком молочной железы в случаях утраты одного и сохранения другого аллеля гена *TP53* в опухолевой ткани не обнаружено метилирование промоторной области данного гена.
4. Частота потери аллеля С (Ex4+119G>C) гена *TP53* в опухолевой ткани существенно выше у больных раком молочной железы с мутантным p53 (5,7, 8-й экзоны и смежные интроны) по сравнению с пациентками, не имеющими p53 мутаций (53,3% против 15,8%; точный критерий Фишера: односторонний $p=0,02$; двусторонний $p=0,03$).
5. В опухолевой ткани больных раком молочной железы идентифицированы четыре новые мутации гена *TP53* (три в интронных областях – с.376-

57A>C, с.673-20G>C, с.919+26_с.919+27ins1 и одна в 7-м экзоне – с.697_699del3), которые не представлены в последней версии IARC *TP53* Database Mutation R14.

6. У пациенток с генотипом C/C (Ex4+119G>C) чаще наблюдался клинически благоприятный локализованный процесс (83,3%) заболевания по сравнению с носителями G/G (35,7%) и G/C (34,4%; точный критерий Фишера: односторонний $p=0,03$; двусторонний $p=0,06$) генотипов.
7. У больных раком молочной железы с экспрессией на клетках опухоли рецепторов к эстрогенам и прогестерону чаще встречаются мутации в полиморфных сайтах гена *TP53* (31,9% и 35,9%), чем у пациенток с отсутствием экспрессии (11,5%; 12,5%; точный критерий Фишера: односторонний $p=0,04$ и $0,02$; двусторонний $p=0,08$ и $0,03$, соответственно).

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Чердынцева Н.В., Слонимская Е.М., Белявская В.А., Бабышкина Н.Н., Сметанникова Н.А., Гервас П.А., **Денисов Е.В.**, Стахеева М.Н., Гарбуков Е.Ю., Малиновская Е.А., Литвяков Н.В., Воевода М.И. Исследование связи полиморфизма генов онкосупрессора *p53*, гена хемокинового рецептора *CCR5* и их сочетаний с риском развития и прогрессированием рака молочной железы // Молекулярная медицина. 2007. № 1. С. 23–31.
2. **Денисов Е.В.**, Литвяков Н.В., Стахеева М.Н., Гарбуков Е.Ю., Слонимская Е.М., Малиновская Е.А., Бабышкина Н.Н., Стегний В.Н., Чердынцева Н.В. Мутации в гене-супрессоре *TP53* и их связь с особенностями клинического течения рака молочной железы // Сибирский онкологический журнал. 2008. № 2. С. 32-36.
3. Перельмутер В.М., Завьялова М.В., Вторушин С.В., Слонимская Е.М., Крицкая Н.Г., Гарбуков Е.Ю., Литвяков Н.В., Стахеева М.Н., Бабышкина Н.Н., Малиновская Е.А., **Денисов Е.В.**, Григорьева Е.С., Назаренко М.С., Сенников С.В., Горева Е.П., Козлов В.А., Воевода М.И., Максимов В.Н., Белявская В.А., Чердынцева Н.В. Генетические и клинко-патологические особенности рака молочной железы у больных с сохраненной менструальной функцией и в менопаузе // Успехи геронтологии. 2008. Т. 21, № 4. С. 643-653.
4. **Denisov E.V.**, Cherdyntseva N.V., Litvjakov N.V., Malinovskaya E.A., Voevoda M.I., Belyavskaya V.A., Stegny V.N. *TP53* mutations and Arg72Pro polymorphism in breast cancer patients' tumors // Cancer Genetics and Cytogenetics. 2009. Vol. 192. P. 93-95.
5. Чердынцева Н.В., Слонимская Е.М., Литвяков Н.В., Стахеева М.Н., Бабышкина Н.Н., Гарбуков Е.Ю., Малиновская Е.А., **Денисов Е.В.**, Дорошенко А.В., Красулина Н.А. Механизмы опухолевой прогрессии: роль генов апоптоза и цитокинов// Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике / Под ред. А.Б. Масленникова. Вып. 11. Новосибирск: Альфа Виста, 2007. С. 28-39.

6. **Денисов Е.В.**, Литвяков Н.В., Слонимская Е.М., Малиновская Е.А., Бабышкина Н.Н., Стегний В.Н., Белявская В.А., Воевода М.И., Чердынцева Н.В. Изучение взаимосвязи Arg72Pro полиморфизма и соматических мутаций гена *TP53* у больных раком молочной железы // Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике / Под ред. А.Б. Масленникова. Вып.13. Новосибирск: Альфа Виста, 2009. С. 66-74.
7. Чердынцева Н.В., Слонимская Е.М., Перельмутер В.М., Завьялова М.В., Вторушин С.В., Гуляева Л.Ф., Пустыльняк В.О., Гарбуков Е.Ю., Литвяков Н.В., Стахеева М.Н., Бабышкина Н.Н., Малиновская Е.А., **Денисов Е.В.**, Григорьева Е.С., Лебедев И.Н., Назаренко М.С., Сенников С.В., Силков А.Н., Жовмер А.С., Горева Е.П., Гришанова А.Ю., Горева О.Б., Середина Т.А., Талабан В.О., Ляхович В.В., Голованова О.В., Шевченко А.В., Салахутдинова М.Ю., Максимов В.Н., Воевода М.И., Коненков В.И., Пузырев В.П., Козлов В.А. Генетические полиморфизмы в риске формирования и прогрессии рака молочной железы в сибирском регионе России // Материалы Сибирско-Тайваньского форума. Томск, 2009. С. 19-25.
8. **Денисов Е.В.**, Гervas П.А. Полиморфизм онкосупрессорного гена p53 и гена хемокинового рецептора CCR5 у больных раком молочной железы // Материалы XLIII международной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс». Новосибирск, 2005. С. 17.
9. Чердынцева Н.В., Белявская В.А., Севостьянова Н.В., Уразова Л.Н., Гervas П.А., Коломиец С.А., Литвяков Н.В., **Денисов Е.В.**, Воевода М.И., Чойнзонов Е.Ц. CCR5 как потенциальный медиатор активности P53: комбинации аллельных полиморфизмов CCR5 и P53 у больных со злокачественными новообразованиями // Тезисы I Российско-американской конференции “Биотехнология и онкология”. Санкт-Петербург, 2005. С. 142-143.
10. Гervas П.А., Бабышкина Н.Н., **Денисов Е.В.**, Слонимская Е.М., Стахеева М.Н., Чердынцева Н.В. Исследование полиморфизма 72 кодона гена p53 у больных раком молочной железы // Материалы итоговой научно-практической конференции с международным участием “Актуальные вопросы здравоохранения регионов Сибири”. Красноярск, 2005. С. 299-300.
11. Чердынцева Н.В., Белявская В.А., Севостьянова Н.В., Гervas П.А., Уразова Л.Н., Слонимская Е.М., Коломиец С.А., Литвяков Н.В., Бабышкина Н.Н., Стахеева М.Н., **Денисов Е.В.**, Воевода М.И., Чойнзонов Е.Л. Исследование роли комбинаций вариантных аллелей генов апоптоза, ферментов метаболизма и цитокинов в риске возникновения и прогнозе клинического течения злокачественных новообразований // Материалы II международной конференции “Молекулярная медицина и биобезопасность”. Москва, 2005. С. 283-284.
12. Гervas П.А., **Денисов Е.В.**, Бабышкина Н.Н., Стахеева М.Н., Слонимская Е.М., Белявская В.А., Чердынцева Н.В. Опухольассоциированный

полиморфизм генов p53 и CCR5 у больных раком молочной железы // Тезисы I Съезда терапевтов Сибири и Дальнего Востока. Новосибирск, 2005. С. 180-182.

13. **Денисов Е.В.**, Гервас П.А., Бабышкина Н.Н., Савенкова О.В., Глущенко С.А., Малиновская Е.А. Полиморфизм участков генов p53 и хемокинового рецептора CCR5: связь с прогрессией рака молочной железы // Материалы XLIV международной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс» Новосибирск, 2006. С. 116.
14. **Денисов Е.В.**, Гервас П.А., Бабышкина Н.Н., Савенкова О.В., Глущенко С.А., Малиновская Е.А. Популяционно-генетический анализ связи полиморфизма участков генов p53 и CCR5 с прогрессией рака молочной железы // Материалы LV научной студенческой конференции биолого-почвенного факультета Томского государственного университета “Старт в науку”. Томск, 2006. С. 3-4.
15. Cherdyntseva N.V., Belyavskaya V.A., Gervas P.A., Fleming M.V., Sevostyanova N.V., Kolomiets S.A., **Denisov E.V.**, Slonimskaya E.M., Voevoda M.I., Perelmuter V.M., Choinzonov E.L. Cytokine and apoptotic gene polymorphism association with cancer progression and prognosis // The proceedings of 3rd International conference. Novosibirsk, 2006. P. 23.
16. Бабышкина Н.Н., Гервас П.А., **Денисов Е.В.**, Сметанникова Н.А., Белявская В.А., Стахеева М.Н., Чердынцева Н.В., Слонимская Е.М. Полиморфизм гена хемокинового рецептора CCR5 и онкосупрессорного белка p53: взаимосвязь с риском формирования и прогрессированием рака молочной железы // Материалы X Российского онкологического конгресса. Москва, 2006. С. 168.
17. **Денисов Е.В.**, Малиновская Е.А., Гарбуков Е.Ю., Бабышкина Н.Н., Литвяков Н.В. Анализ полиморфизма и соматических мутаций гена p53 при раке молочной железы // Материалы XLV международной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс». Новосибирск, 2007. С. 149-150.
18. **Денисов Е.В.**, Малиновская Е.А., Гарбуков Е.Ю., Бабышкина Н.Н., Литвяков Н.В., Чердынцева Н.В. Генетический полиморфизм и мутации онкосупрессорного гена p53 у больных раком молочной железы // Тезисы XIV международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2007». Москва, 2007. С. 51-52.
19. **Денисов Е.В.**, Литвяков Н.В., Слонимская Е.М., Малиновская Е.А., Бабышкина Н.Н., Григорьева Е.А., Гарбуков Е.Ю., Чердынцева Н.В. Взаимосвязь Arg72Pro полиморфизма гена p53 с уровнем соматических мутаций того же гена в клетках рака молочной железы // Материалы 3-й Российской конференции по фундаментальной онкологии «Петровские чтения-2007». Санкт-Петербург, 2007. С. 12-13.
20. **Денисов Е.В.**, Малиновская Е.А., Гарбуков Е.Ю., Бабышкина Н.Н., Литвяков Н.В. Мутации и полиморфизм в гене p53 у больных раком молочной железы // Материалы LVI научной студенческой конференции био-

лого-почвенного факультета Томского государственного университета “Старт в науку” Томск, 2007. С. 8-9.

21. **Денисов Е.В.**, Малиновская Е.А., Гарбуков Е.Ю., Бабышкина Н.Н., Литвяков Н.В. Взаимосвязь соматических мутаций полиморфизма гена p53 у больных раком молочной железы // Материалы региональной конференции молодых ученых им. Академика РАМН Н.В. Васильева “Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии”. Томск, 2007. С. 39-41.
22. **Денисов Е.В.**, Бабышкина Н.Н., Малиновская Е.А., Гарбуков Е.Ю., Литвяков Н.В., Слонимская Е.М., Чердынцева Н.В. Статус гена p53 при раке молочной железы: взаимосвязь мутаций и полиморфизма 72 кодона // Материалы III международной конференции «Фундаментальные науки - медицине». Новосибирск, 2007. С. 23.
23. Чердынцева Н.В., Гервас П.А., Малиновская Е.А., Бабышкина Н.Н., Литвяков Н.В., **Денисов Е.В.**, Слонимская Е.М., Стахеева М.Н., Тузиков С.А., Белявская В.А., Воевода М.И., Перельмутер В.М. Подходы генетической эпидемиологии: от оценки риска до прогнозирования исхода злокачественных новообразований // Материалы III международной конференции «Фундаментальные науки - медицине». Новосибирск, 2007. С. 81.
24. **Денисов Е.В.**, Бабышкина Н.Н., Малиновская Е.А., Гарбуков Е.Ю., Литвяков Н.В. Полиморфизм и частота соматических мутаций гена p53 у больных раком молочной железы // Научные труды VIII конференции с международным участием “Генетика человека и патология”. Томск, 2007. С. 311-312.
25. Чердынцева Н.В., Гервас П.А., Малиновская Е.А., **Денисов Е.В.**, Бабышкина Н.Н., Литвяков Н.В., Слонимская Е.М., Стахеева М.Н., Тузиков С.А., Гарбуков Е.Ю., Перельмутер В.М., Белявская В.А., Воевода М.И. Полиморфизм гена онкосупрессора p53 и функционально связанных генов в оценке риска и прогноза злокачественных новообразований // Научные труды VIII конференции с международным участием “Генетика человека и патология”. Томск, 2007. С. 324-325.
26. **Денисов Е.В.**, Малиновская Е.А., Гарбуков Е.Ю., Бабышкина Н.Н., Вторушин С.В., Глущенко С.А., Литвяков Н.В. Мутации гена TP53 при раке молочной железы и их взаимосвязь с клинико-патологическими параметрами заболевания // Материалы III региональной конференции молодых ученых им. Академика РАМН Н.В. Васильева “Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии”. Томск, 2008. С. 39-40.
27. Бабышкина Н.Н., Малиновская Е.А., **Денисов Е.В.**, Стахеева М.Н., Слонимская Е.М., Чердынцева Н.В. Изучение связи полиморфных вариантов генов CCR5 и P53 с лимфогенным метастазированием у больных раком молочной железы // Материалы Российской научно-практической

- конференции “Современные аспекты диагностики и лечения рака молочной железы”. Томск, 2008. С. 25-26.
28. **Денисов Е.В.**, Бабышкина Н.Н., Малиновская Е.А., Литвяков Н.В., Стегний В.Н., Чердынцева Н.В. Селективная инактивация Arg72Pro аллелей гена *TP53* при раке молочной железы // Материалы всероссийской конференции с международным участием “Молекулярная онкология”. Новосибирск, 2008. С. 13-14.
 29. Бабышкина Н.Н., Малиновская Е.А., **Денисов Е.В.**, Стахеева М.Н., Чердынцева Н.В., Слонимская Е.М. Взаимосвязь полиморфных вариантов гена-онкосупрессора p53 и гена хемокинового рецептора CCR5 с риском возникновения и прогрессированием рака молочной железы // Материалы всероссийской конференции с международным участием “Молекулярная онкология”. Новосибирск, 2008. С. 77-78.
 30. Чердынцева Н.В., Белявская В.А., Гervas П.А., Добродеев А.Ю., **Денисов Е.В.**, Малиновская Е.А., Бабышкина Н.Н., Литвяков Н.В., Тузиков С.А., Слонимская Е.М., Перельмутер В.М. Роль гена p53 в формировании и прогрессии злокачественных новообразований // Материалы всероссийской конференции с международным участием “Молекулярная онкология”. Новосибирск, 2008. С. 165-166.
 31. **Denisov E.V.**, Babyshkina N.N., Litvjakov N.V., Malinovskaya E.V., Slonimskaya E.M., Stegnyy V.N., Cherdyntseva N.V. *TP53* gene mutations and Pro72Arg polymorphism in breast patient’s tumour // Abstract Book of IM-PAKT Breast Cancer Conference. Brussels, 2009. P. ii38.
 32. **Денисов Е.В.**, Сухановская Т.В., Литвяков Н.В., Малиновская Е.А., Слонимская Е.М., Чердынцева Н.В. Статус гена *TP53* как прогностический маркер рака молочной железы // Материалы Сибирско-Тайваньского форума. Томск, 2009. С. 102-103.
 33. **Денисов Е.В.**, Сухановская Т.В., Дульцева Т.С., Малиновская Е.А. Полиморфизм Arg72Pro гена *TP53* в опухолевой ткани: связь с характером опухолевого роста рака молочной железы // Материалы V региональной конференции молодых ученых им. Академика РАМН Н.В. Васильева “Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии”. Томск, 2010. С. 38-39.
 34. Дульцева Т.С., Сухановская Т.В., **Денисов Е.В.** Новые мутации в гене-супрессоре опухолевого роста *TP53* у больных раком молочной железы // Материалы V региональной конференции молодых ученых им. Академика РАМН Н.В. Васильева “Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии”. Томск, 2010. С. 39-40.