



## ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВОГО СЕМЕЙСТВА ИНТЕРЛЕЙКИНА-1 И ЯДЕРНОГО ФАКТОРА-кВ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Ишбулатова Н.И., Васильева Э.М., Николаев И.В., Горбунова В.Ю.

Башкирский государственный педагогический университет имени М.Акумлы, г.Уфа, [nurzilya94@mail.ru](mailto:nurzilya94@mail.ru)

### Резюме

Проведен анализ ассоциации полиморфных маркеров генов ядерного фактора-кВ (*rs147169338*, *rs45581936*) и семейства интерлейкина-1 (*rs1143634*, *rs2287047*, *VNTR IL1R1*, *InDel Alu Ya5NBC51*) с предрасположенностью к раку молочной железы. Выявлено наличие протективных аллелей по полиморфным маркерам генов субъединиц ядерного фактора-кВ у всех исследуемых индивидов, что свидетельствует о нормальном функционировании данного транскрипционного фактора. Увеличение частоты аллеля *IL1RN\*II* и генотипа *II/II* в группе больных РМЖ по сравнению со здоровыми, свидетельствует об ассоциации данного варианта полиморфного маркера с развитием рака молочной железы. Данный полиморфизм влиял на уровень экспрессии гена и как следствие, на концентрацию интерлейкина-1 в межклеточном пространстве, что увеличивает пролиферацию клеток и может стимулировать у онкологических больных развитие метастазов.

**Ключевые слова:** рак молочной железы, ядерный фактор-кВ, *NF-кВ1*, *NF-кВ2*, интерлейкин-1, *IL-1β*, *IL1RN*, *IL1R1*, *IL1RAP*.

Рак молочной железы (РМЖ) - злокачественное новообразование, развивающееся из клеток эпителия протоков и долек паренхимы железы. Возникновение рака определяет сложное взаимодействие между эндокринной и иммунной системами организма, воздействующих на трансформированные под влиянием различных канцерогенов клетки.

По данным экспериментальных исследований, одним из перспективных молекулярных маркеров РМЖ считают полифункциональный ядерный транскрипционный фактор NF-кВ, который играет важную роль в клеточной пролиферации, апоптозе, воспалительной и аутоиммунной реакциях, регулируя экспрессию генов, вовлеченных в эти процессы [Грештейн, 2013]. Ядерный фактор-кВ представляет собой семейство из пяти белков — p50/105 (NF-кВ1) p52/100 (NF-кВ2), p65 (RelA), c-Rel и RelB. Несмотря на множество форм, классическим типом NF-кВ является гетеродимер p50-p65. NF-кВ присутствует в цитоплазме в неактивной форме, находясь в комплексе с ингибиторными IкВ-белками. Все они имеют несколько так называемых анкириновых повторов (состоят из 30-33 аминокислот), связывающихся с Rel-доменом NF-кВ. При стимуляции NF-кВ подвергаются

фосфорилированию и убиквитинизации. Это меняет конформационную структуру молекул, определяя их распознавание и разрушение внутри протеосом, что, в свою очередь, приводит к высвобождению NF-кВ, который после дополнительного фосфорилирования получает возможность мигрировать в ядро клетки, к месту своего действия [Маянский, 2007]. Белки семейства NF-кВ связываются со специфическими сайтами на молекуле ДНК и изменяет интенсивность транскрипции различных генов задействованные в иммунном, острофазовом и воспалительном ответах. К числу таких генов относятся гены семейства интерлейкина-1.

Синтез IL-1 начинается в ответ на внедрение микроорганизмов, либо повреждение тканей и необходим для развития местного воспаления и осуществления острофазового ответа [Симбирцев, 1991]. IL-1β продуцируют моноциты, макрофаги, эндотелиальные клетки, Т- и В-лимфоциты, дендритные клетки, эпителиальные клетки, кератиноциты, фибробласты, а также опухолевые клетки [Ferrero-Miliani et al., 2007]. IL-1β может влиять на опухолевый рост, метастазирование и ангиогенез за счет активации факторов транскрипции NF-кВ и AP-1, выработки матриксных металлопротеиназ, ростовых факторов и молекул адгезии [Lewis, 2006]. По

механизму положительной обратной связи в результате активации NF-κB в плазме крови повышается уровень провоспалительных цитокинов IL-1β и TNF-α. IL-1 способствует продукции IL-6, который, являясь как провоспалительным и может стимулировать пролиферацию опухолевых клеток, так и противовоспалительным цитокином.

IL-1 стимулирует клеточные ответы путем взаимодействия с гетеродимерным рецепторным комплексом, состоящим из двух трансмембранных белков, белка-рецептора IL-1 типа 1 (IL-1R1) и вспомогательного белка-рецептора IL-1 (IL-1RAcP). IL-1 сначала связывается с IL-1R1; затем IL-1RAcP рекрутируется в этот комплекс с последующим преобразованием сигнала, что приводит, в результате, к индукции клеточного ответа [Greenfeder et al., 1995]. IL-1Ra существует в виде секретируемой изоформы – sIL-1Ra и внутриклеточных изоформ – icIL-1Ra1, icIL-1Ra2 и icIL-1Ra3. Секретируемая изоформа sIL-1Ra, связываясь с рецептором IL-1 I типа, не вызывает дальнейшей передачи сигнала и препятствует взаимодействию IL-1 с этим рецептором на клеточной мембране [Соснина, 2011].

У человека гены, кодирующие IL-1β, IL1R1, IL1RA локализованы на коротком плече 2 хромосомы. А ген *IL1RAcP* расположен на коротком плече 3 хромосомы. В данной работе изучено распределение частот аллелей и генотипов полиморфных маркеров по генам: *IL1B C3953T*, *IL1R1 T-976C* – синонимическая замена нуклеотидов, *IL1RN VNTR 86bp* - дупликация, *IL1RAP* по типу Alu инсерция/делеция, и миссенс мутации *NFKB1 Ser851Arg*, *NFKB2 Glu14Lys*.

Полиморфизм *IL-1β*, локализован в 5 экзоне по типу транзиции (3953C >T). У лиц, гомо- или гетерозиготных по высокопродуктирующему аллелю (\*E2), продуцируется, соответственно, в 4 и 2 раза большее количество этого цитокина, чем у лиц, гомозиготных по не мутантному (\*E1) варианту этого гена [Громова, 2005].

*VNTR* (variable number tandem repeat) полиморфизм по 86 п.н. локализован во втором интроне гена *IL1RN*. Известны аллели \*I (410 п.н.), \*II (240 п.н.), \*III (500 п.н.), \*IV (325 п.н.), \*V (595 п.н.). Чаще встречающийся аллель гена *IL-1RN*\*I содержит четыре тандемных повтора по 86 п.н.. Наиболее значимым из мутантных вариантов является аллель *IL-1RN*\*II, несущий два повтора, остальные варианты этого гена (3, 5 и 6 повторов) встречаются редко. Носительство аллеля *IL-1RN*\*II связано с повышенным уровнем циркулирующего *IL-1RN* в 10 и более раз и уровнем экспрессии мРНК в ходе воспаления [Громова, 2005].

Ген добавочного белка рецептора интерлейкина-1 (*IL1RAP*) расположен на 3 хромосоме в локусе q28. В третьем интроне этого

гена располагается полиморфный Alu- элемент *Ya5NBC51*. *IL1RAP* был идентифицирован в 1995 году, как компонент, необходимый для нормального осуществления своей функции рецепторами IL-1.

Полиморфизм гена *IL1R1* по типу транзиции (-976T>C, *rs2287047*), приводит к изменению конформации данного белка. Аллель \*T обуславливает нормальную конформацию белка, аллель \*C – измененную [Bergholdt, 2000]. Полиморфные маркеры генов *NF-kB1* (4q24) и *NF-kB2* (10q24) относятся к миссенс мутациям, которые затрагивают важнейшие домены в белковых продуктах, нарушая их организацию и активацию процесса транскрипции.

### Материалы и методы

В работе использованы образцы ДНК 270 человек, проживающих в Республике Башкортостан. Из них 135 здоровых индивидов и 135 больных раком молочной железы, находившихся на стационарном лечении в ГБУЗ Республиканском клиническом онкологическом диспансере МЗ Республики Башкортостан. В качестве здоровых индивидов были отобраны лица, являющиеся носителями «нормальных» аллелей гена *TP53* по 3 полиморфным локусам (*rs1042522, G/C; rs1625895, G/A; DUP16bp*), ранее исследованным на кафедре генетики БГПУ им.М.Акмиллы [Gantsev, 2013].

Выделение ДНК из периферической крови проводилось стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции [Mathew, 1984]. Определение генотипов полиморфных локусов генов *NF-kb1*, *NF-kb2*, *IL-1β*, *IL1RN*, *IL1R1*, *IL1RAP* проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) по Mullis К.В (1986) на амплификаторе «Терцик» с использованием ПЦР-микса фирмы Евроген. Условия ПЦР были следующими: использовали реакционную смесь объемом 10 мкл, которая содержала 1,5 мкл 5хПЦР-микса, 3,5 инъекционной воды, ДНК- 1,5 мкл, по 2 мкл каждого праймера. Последовательности праймеров, температура отжига и эндонуклеазы рестрикции приведены в табл. 1. Результаты амплификации оценивались путем проведения вертикального электрофореза в 7% полиакриламидном геле по Маниатису Т. (1984).

Для проверки соответствия эмпирического распределения частот генотипов теоретическому равновесному распределению Харди-Вайнберга использовали модифицированный критерий  $\chi^2(P)$ . При попарном сравнении частот генотипов и аллелей в двух различных группах использовался двусторонний критерий Фишера р (F<sub>2</sub>). Достоверными считали различия частот аллелей и генотипов при значении P≤0.05.

Таблица 1

Тип полиморфизма, последовательность праймеров и номенклатура аллелей анализируемых ДНК-локусов

Ген	Полиморфизм	Праймеры (эндонуклеазы рестрикции)	Температура отжига праймера (°C)	Алели (размер фрагментов, п.о.)	Ссылка
<i>IL-1β</i> (2q14)	3954C>T (rs1143634)	5'-GTTGTCATG AGA CTT TGA CC-3' 5'-TTC AGT TCA TAT GGA CCA GA GA-3' (TaqI)	55	*E1 (135+114); *E2 (249)	Chen et al., 2001
<i>IL1RN</i> (2q14.2)	VNTR (2 – 6 копий 86 п.н.)	5'-CTCAGCAACACTCCCTAT-3'; 5'-TCCCTGGTCTGCAGGTA-3'	56	*I (410); *II (240); *III (500); *IV (325); *V (595)	Chen et al., 2001
<i>IL1RI</i> (2q12)	-976T>C (rs2287047)	5'-TGATCTGAATTCTCACATGACCTTG-3'; 5'-GGCACCACAAAACCTGGAGAAATAG-3' (AluI)	50	*T (450) *C (400)	Bergholdt et al., 2000
<i>IL1RAP</i> (3q28)	Ya5NBC51 InDel	5' ATATTCCAGAAGTTCCCTTACATCTAGTGC-3'; 5' -AAAGCTTAAAGTCTCCACCATCTCT-3'	60	*I (140) *D (437)	Watkins et al, 2001
<i>NF-κb2</i> (10q24.32)	Glu14Lys (rs45581936)	5'-GCCCTCCAAAAGGAGCTTCTC-3'; 5'-TGTTCCACGATCACCAGGTAG-3' (Ttr9 I)	60	*T(148+209) *G(357)	Собственный дизайн
<i>NF-κb1</i> (4q24)	Ser85IArg (rs147169338)	5'-CTTCAGGAGACATGAAACAGCT-3'; 5'-TGGCCAGAGATGTTAACAGAGTA-3' (HinfI)	61	*G (244) *T (138+106)	Собственный дизайн

### Результаты и обсуждение

В результате анализа распределения частот аллелей и генотипов по сайтам *Ser851Arg* гена *NF-kb1* и *Glu14Lys* гена *NF-kb2* выявлено наличие аллелей \**Ser* и \**Glu* соответственно. То есть индивиды в исследуемых группах обладают нормально функционирующими продуктами данных генов.

При анализе *VNTR*-полиморфизма в гене рецепторного антагониста интерлейкина-1 (*IL1RN*) выявлено достоверное повышение в группе здоровых генотипа *I/I* с частотой 45% ( $p=0,03$ ,  $\chi^2=4,81$ ), и аллеля \**I* с частотой 63% ( $p=0,0005$ ,  $\chi^2=19,37$ ). В группе онкобольных было отмечено достоверное повышение генотипов *I/II* ( $p=0,04$ ,  $\chi^2=4,30$ ) и *III/II* ( $p=0,0005$ ,  $\chi^2=27,12$ ) и аллеля \**II* с частотой 55% ( $p=0,0005$ ,  $\chi^2=19,37$ ), что не противоречит имеющимся публикациям [Hurme, 1998]. Поскольку *IL1Ra* является эндогенным ингибитором интерлейкина-1, наличие «непротективного» аллеля *IL1RN\*II* может обуславливать повышенный уровень циркулирующего рецепторного антагониста *IL-1*, что приводит к накоплению *IL-1B* в межклеточном пространстве.

Анализ сочетаний аллелей четырех генов семейства интерлейкина-1 (*IL1B*, *IL1R1*, *IL1RN*, *IL1RAP*) выявил статистически значимые различия между исследованными группами. Так, сочетание аллелей \**E1*/\**T*/\**I*/\**D* ( $p=0,0252$ ,  $\chi^2=5,0372$ ) достоверно чаще встречается у здоровых за счет нормального функционирования самих белков и сигнального каскада интерлейкина-1.

Выявлено достоверное повышение частоты сочетания аллелей \**E1*/\**T*/\**II*/\**I* ( $p=0,0517$ ,  $\chi^2=3,7859$ ) в группе онкобольных. Нарушения в структуре *IL1RAP* в результате мутаций, также способны снизить сродство *IL-1*- рецепторного комплекса к лигандам до 5 раз. Увеличение в межклеточном пространстве несвязавшегося интерлейкина увеличивает пролиферацию клеток и может стимулировать у онкологических больных развитие метастазов [Бережная, 2009].

Анализ четырехлокусной модели взаимодействия генов семейства интерлейкина-1 выявил 64 сочетания генотипов из 81 возможного, из них *E1E1/CT II II/ID* встречается чаще у больных, что доказывает вклад рецепторного комплекса интерлейкина-1 в развитие болезни ( $p=0,03$ ,  $\chi^2=4,77$ ).

Анализ межгенных взаимодействий показал, что наибольшее влияние на развитие рака молочной железы оказывает ген *IL1RN* (8,40%). Выявлено, что наибольшей силой взаимодействия обладают гены *IL1RN* и *IL1RAP*, *IL1RN* и *IL1R1*, *IL1B* и *IL1RAP*. Между генами *IL1B* и *IL1RAP* (энтропия - 0,54%), а также между генами *IL1RAP* и *IL1R1* (энтропия - 0,43%) проявляется синергичное взаимодействие, которое усиливает влияние друг друга при развитии онкопатологии.

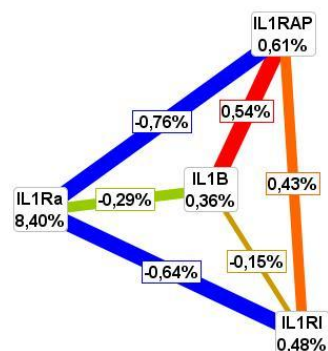


Рис.1. Модель межгенных взаимодействий элементов семейства интерлейкина-1

Примечание: Толщина линий графа демонстрирует силу взаимодействия локусов, цвет линий графа - характер взаимодействия локусов, проценты на гранях и вершинах графа - уровень энтропии оптимального взаимодействия элементов системы. Красным и оранжевым указывается синергизм, т.е. взаимное усиление эффектов между локусами; синим и зеленым- дублирование эффектов между локусами; коричневый цвет указывает на независимость эффектов отдельных локусов

### Заключение

В данной работе изучено распределение частот генотипов и аллелей полиморфных маркеров генов ядерного фактора-кВ (*NF-kb1*, *NF-kb2*) и семейства интерлейкина-1 (*IL1B*, *IL1R1*, *IL1RN*, *IL1RAP*) при РМЖ и проведен сравнительный анализ сочетаний генотипов и аллелей полиморфных локусов указанных выше генов.

Установлено, что в группе здоровых индивидов достоверно чаще встречаются носители протективных аллелей по исследуемым генам. Выявлена повышенная частота двухкопийных генотипов *VNTR* локуса гена *IL1RN*- *III/II* и гетерозигот *I/II*, а также аллеля \**II* у больных РМЖ, что свидетельствует о вкладе *IL1RN* в развитие данной патологии. Выявлено, что сочетание генотипов *E1E1/CT II II/ID*, которое приводит к увеличению концентрации *IL1B* в межклеточном пространстве и нарушению передачи сигнала в клетку, чаще встречается у больных раком молочной железы.

### Список цитированной литературы

1. Бережная Н.М. Роль клеток системы иммунитета в микроокружении опухоли. Взаимодействие клеток системы иммунитета с другими компонентами микроокружения // Онкология. 2009. Т. 11. №2. С. 86–93.
2. Герштейн, Е. С. Клинические исследования компонентов *NF-kB*-сигнального пути в злокачественных опухолях молочной железы// Лабораторная служба. - 2013. - № 1. - С. 39-45.
3. Громова А. Ю. Полиморфизм генов семейства *IL-1* человека / А. Ю. Громова, А.

- С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. – 2005. – Т. 4. – № 2. – С. 3–12.
4. Маянский А.Н., Маянский Н.А., Заславская М.И. Нуклеарный фактор-кВ и воспаление. Цитокины и воспаление. 2007. Т. 6, № 2. С. 3-9.
  5. Симбирцев А.С., Конусова В.Г., Кетлинский С.А. Иммуноцитохимический анализ продукции интерлейкина-1 $\beta$  моноцитами человека // Бюлл. exper. биол. мед.- 1991.- № 9.- С. 278-280.
  6. Соснина А.В., Великая Н.В., Аутеншлюс А.И. Роль цитокинов в патогенезе злокачественных новообразований / Новосибирск: Вектор-Бест, 2013. – 80 с.
  7. Bergholdt R., Larsen Z.M., Andersen N.A. et al. Characterization of new polymorphisms in the 5' UTR of the human interleukin-1 receptor type 1 (IL1R1) gene: linkage to type 1 diabetes and correlation to IL-1RI plasma level // Genes and immunity. 2000. V.1. P. 495–500.
  8. Chen W.-C., Wu H.-C., Chen H.-Y., et al. Interleukin-1 $\beta$  gene and receptor antagonist gene polymorphisms in patients with calcium oxalate stones // Urol Res. 2001. V. 29. P. 321–324.
  9. Ferrero-Miliani L, Nielsen OH, Andersen PS, Girardin SE. Chronic inflammation: Importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 $\beta$  generation. Clin Exp Immunol 2007; 147:227–35.
  10. Gantsev S.K., Gorbunova V.Y., Galikeeva G.F., Vorobyeva E.V., Vasilyeva E.M., Rustamhanov R.A. Molecular Genetic Study of the Allelic State of the Cell Cycle Genes (TP53, BRCA1) and Features of the Regulation of the Cytokine Cascade in Breast Cancer // Journal of Cancer Research Updates, 2013. Vol.2. P.211-219.
  11. Greenfeder S., Nunes G., Kwee L., Labow M., Chizzonite R. and Ju G. (1995) Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex. J. Biol. Chem. 270, 13747-13756.
  12. Hurme M., Santtila S. IL-1 receptor antagonist (IL-1RA) plasma levels are coordinately regulated by both IL-1RA and IL-1 $\beta$  genes // Eur J Immunol. 1998. V. 28. P. 2598–2602.
  13. Lewis A. M. Interleukin-1 and cancer progression: the emerging role of interleukin-1 receptor antagonist as a novel therapeutic agent in cancer treatment / A.M. Lewis, S. Varghese, H. Xu, H.R. Alexander // J. Transl. Med. – 2006. – Vol. 4. – P. 48.
  14. Mathew C.C. The isolation of high molecular weight eukaryotic DNA // Methods in Molecular Biology / Ed. Walker J.M.N. Human Press. 1984. V. 2. P. 31–34.
  15. Watkins LR, Milligan ED, Maier SF. Glial activation: a driving force for pathological pain // Trends in Neuroscience. 2001;24:450–455.

#### THE STUDY OF POLYMORPHIC VARIANTS OF CYTOKINE GENES ASSOCIATED WITH INTERLEUKIN-1 AND NUCLEAR FACTOR KAPPA B IN BREAST CANCER

Ishbulatova N.I., Vasilyeva E.M., Nikolaev I.V., Gorbunova V.Y.

M.Akmullah Bashkir State Pedagogical University, Ufa, [nurzilya94@mail.ru](mailto:nurzilya94@mail.ru)

#### Resume

The analysis of the association of polymorphic markers of genes of nuclear factor kappa B (rs147169338, rs45581936) and the family of interleukin-1 (rs1143634, rs2287047, VNTR IL1R1, Alu InDel Ya5NBC51) with a susceptibility to breast cancer. Revealed the presence of protective alleles at polymorphic markers of genes subunits of nuclear factor-kb in all studied individuals, indicating a normal functioning of this transcription factor. An increase in the frequency of allele IL1RN\*genotype II and II/II in the group of breast cancer patients compared with healthy, indicates the association of this variant of the polymorphic marker with the development of breast cancer. This polymorphism influenced the level of gene expression and as a consequence, the concentration of interleukin-1 in the intercellular space, which increases the proliferation of cells and can stimulate the cancer patients develop metastases.

**Keywords:** breast cancer, nuclear factor kappa B, NF-kb1, NF-kb2, interleukin 1, IL-1 $\beta$ , IL1RN, IL1R1, IL1RAP