

УДК 575.224.46

Ф.Т. Муратова\*, Нуржибек,  
Б.Б. Жунусбекова, Э.М. Хусаинова, Б.О. Бекманов,  
Л.Б. Джансугурова, Р.И. Берсимбай

РГП «Институт общей генетики и цитологии» КН МОН РК, Алматы, Казахстан,  
\*e-mail: f.muratova@list.ru

### Изучение полиморфизма Lys751Gln гена репарации ДНК (XPD) у людей, подвергшихся действию радиации

В статье приводятся данные анализа полиморфизма гена эксцизионной репарации ДНК *XPD* у людей, подвергшихся действию радиации и, проживающих на территории бывшего Семипалатинского ядерного полигона. Как показывают результаты статистического анализа, относительно высокие показатели риска радиочувствительности определены для гомозигот *XPD* Lys751Lys (OR=1.42).

**Ключевые слова:** генетический банк, генетический полиморфизм, гены репарации ДНК

Ф.Т. Муратова, Нуржибек, Б.Б. Жунусбекова, Э.М. Хусаинова,  
Б.О. Бекманов, Л.Б. Джансугурова, Р.И. Берсимбай

### ДНК молекуласының репарациясы гендің (XPD) Lys751Gln полиморфизмі анықтау

Зерттеу жұмысының негізгі мақсаты Семей ядролық полигоны аймағындағы бірнеше ұрпақ көлемінде тұрғындардан жиналған генетикалық материалдар негізінде жеке радиосезімталдылықты анықтау болып табылады. Зерттеу нәтижелері: ДНК молекуласының эксцизионды репарациясы процесіне қатысатын гендің (*XPD* Lys751Gln) полиморфизмі зерттелді. Жеке радиосезімталдықпен *XPD* Lys751Lys (OR=1.42) генотипі байланыс болатыны анықталды.

**Түйін сөздер:** генетикалық қор, генетикалық полиморфизм, ДНК молекуласының репарациясы гендері

F.T. Muratova, Nurzhibek, B.B. Zhunusbekova, E.M. Khussainova,  
B.O. Bekmanov, L.B. Djansugurova, R.I. Bersimbay

### The study of DNA repair gene XPD Lys751Gln polymorphism of population exposed to radiation

The aim of the study was to investigate the association of polymorphism of DNA reparation gene *XPD* Lys751Gln with individual radiosensitivity of people living in former Semey nuclear test site. Molecular genetics methods used to perform this task revealed *XPD* Lys751Gln genotypes among the two cohorts. It was shown that Lys751Lys variant was associated with individual radiosensitivity (OR=1.42).

**Keywords:** genetic bank, genetic polymorphism, DNA repair genes

Загрязнение окружающей среды является причиной повышения темпа мутационного процесса и объема генетического груза в популяциях человека, о чем свидетельствует рост числа наследственных и мультифакторных заболеваний, врожденных патологий и пороков развития, особенно выраженный в экологически неблагоприятных регионах. В Казахстане имеется целый ряд экологических проблем, связанных, в первую очередь, с существованием Семипалатинского полигона ядерных испытаний, а также развитием уранового производства. Поэтому

оценка генетического риска для населения Казахстана, подвергнутого воздействию ионизирующего облучения, имеет особое значение.

При оценке генетического риска влияния радиации особое внимание исследователей привлекает индивидуальная радиочувствительность. Радиочувствительность является индивидуальным признаком, варьирующим от индивида к индивиду в пределах одного вида, что зачастую обусловлено полиморфизмом ДНК-репарирующих генов [1]. Поэтому одной из важных задач является изучение полимор-

физма ДНК–репарирующих генов, связи нарушений работы этих генов с целым рядом болезней, вторичное усиление мутаций вследствие мутаций в генах репарации ДНК и связи с хромосомными aberrациями [2].

Одну из основных функций в поддержании стабильности генома выполняет система эксцизионной репарации ДНК. Важнейшими структурными компонентами системы эксцизионной репарации нуклеотидов и оснований являются белки, кодируемые геном *XPB*.

Ген *XPB/ERCC2* (xeroderma pigmentosum D / excision repair cross complementing 2) локализован на хромосоме 19q32.2 и кодирует АТФ-независимую хеликазу, участвующую в эксцизионной репарации нуклеотидов. Ген содержит 23 экзона и охватывает область размером около 54000 пар оснований. Было идентифицировано несколько полиморфизмов в кодирующей части гена, приводящий к аминокислотным заменам: Ile199Met (C/G), His201Tyr, Ile199Met (C/G), **is201Tyr (C/T)**, **Asp312Asn (G/A)** и **Lys751Gln (A/C)**. Замена (A35931C) приводящая к Lys751Gln меняет конфигурацию белка и может влиять на его взаимодействие с хеликазным активатором p44.

Функциональное значение вариантов *XPB* не вполне ясно, но показано, что некоторые варианты могут быть ассоциированы с уменьшением репаративной способности. В последнее время большое число исследований посвящено анализу ассоциаций полиморфных вариантов гена *XPB* и риска рака различных локализаций: головы и шеи, легких, молочной железы и др. [3].

Целью данной работы являлся поиск ассоциативной связи между полиморфизмом Lys751Gln гена *XPB* и индивидуальной радиочувствительностью у людей, проживающих в районе бывшего Семипалатинского ядерного полигона.

### Материалы и методы

Материалом для исследований служила коллекция биообразцов, представляющая несколько поколений людей, проживающих на территории действия бывшего Семипалатинского ядерного полигона (435 чел.). В качестве контроля исследована популяция жителей из экологически благополучного региона Алматинской области (213 чел.), подобранная в соответствии к облученной группе.

ДНК выделяли стандартным фенол-хлороформным методом, а также с использованием коммерческих китов, согласно методике производителя. Количественную и качественную оценку препаратов ДНК проводили с помощью спектрофото-метрического и электрофоретического анализов.

Генотипирование полиморфизма Lys751Gln гена *XPB* проводили с помощью ПЦР и последующим рестрикционным. Условия ПЦР для гена *XPB* Lys751Gln состояли из: начальной денатурирующей температуры 94°C – 3 минуты, затем проводили 38 циклов амплификации в режиме 94°C – 45 минут, 60°C – 45 минут, 72°C – 1 минута. Реакция заканчивалась с заключительным шагом 72°C – 7 минут. После амплификации продукты ПЦР (436 п.о.) подвергались обработке рестрикционной эндонуклеазы PstI. Продукты амплификации и рестрикции подвергали электрофорезу в 3% полиакриламидном геле и визуализацией фрагментов в проходящем УФ-свете с помощью трансиллюминатора.

В результате рестрикционного анализа *XPB* Lys751Gln давал следующие фрагменты: генотип Lys/Lys – 290, 146 п.о., генотип Lys/Gln – 290, 227, 146 и 63 п.о., тогда как генотип Gln/Gln – 227, 146 и 63 п.о. Статистический анализ выполнялся с применением программного обеспечения Software GraphPad Instat™ (V.2.04. Ralf Stahlman, Purdue University) и «Калькулятора для расчета статистики в исследованиях «случай-контроль»».

### Результаты и их обсуждение

В результате ранее проведенных исследований в лаборатории молекулярной генетики Института общей генетики и цитологии создан уникальный генетический банк, представляющий популяции, проживающие вокруг территории бывшего Семипалатинского ядерного полигона (п. Канонерка, п. Карамырза, п. Бодене, п. Долонь, п. Чаган, п. Мостик Восточно-Казахстанской области), а также биоматериалы контрольных популяций Алматинской области (п. Дзержинск, п. Уштобе, п. Жанаталап), подобранных в соответствии с облученными группами. Таким образом, контрольная и облученная популяции имеют сходный климато-географический, социальный и этнический фон.

Нами был проведен анализ полиморфизма гена эксцизионной репарации ДНК *XPB* в кон-

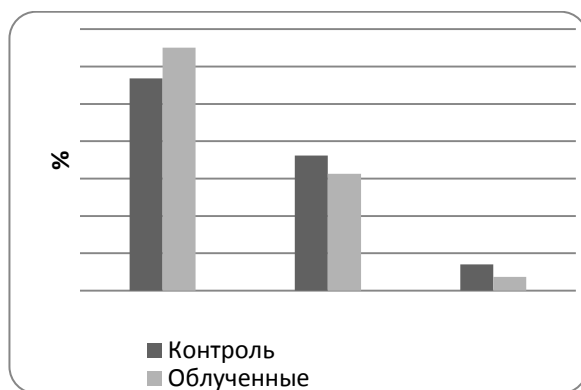
трольной и облученной популяциях. Результаты распределения генотипов по полиморфизму Lys751Gln гена *XPD* в обеих исследуемых когортах представлены на рисунке 1. Частота аллеля 751Lys в облученной популяции составила 0,806, аллеля 751Gln – 0,194. В контрольной популяции частоты аллелей 751Lys и 751Gln: 0,749 и 0,251 соответственно. Согласно нашим результатам в исследуемой нами казахстанской популяции частота аллеля 751Lys выше, чем частота аллеля 751Gln. В обеих исследуемых когортах распределение генотипов соответствовало распределению Харди Вайнберга.

Литературный анализ по частоте распространения аллелей и генотипов *XPD* полиморфизма Lys751Gln в изученных популяциях говорит о том, что аллель Gln наиболее распространен в Европе и Северной Америке, около 50 % представителей европейской и северо-американской популяций имеют гетерозиготный генотип Lys751Gln, 10-15 % имеют гомозиготный генотип Gln751Gln. У представителей афро-американской популяции аллель Gln встречается гораздо реже и процент гомозиготности по Gln751Gln составляет всего 5,6%. В азиат-

ской популяции, также данный аллель встречается редко: почти 90 % азиатов имеют гомозиготный генотип Lys751Lys. Таким образом, можно заключить, что минорные варианты *XPD* Lys751Gln широко распространены у представителей белой расы и значительно реже встречается у азиатов.

В таблице 1 суммированы результаты статистического анализа ассоциации изученного полиморфизма Lys751Gln гена *XPD* с фактором облучения в популяции жителей Семпалатинского региона и соответствующего контроля.

Как показывают результаты статистического анализа, относительно высокие показатели риска радиочувствительности определены для гомозигот *XPD* Lys751Lys (OR=1.42). Как упоминалось ранее, редкие мутации гена *XPD* определяют дефекты эксцизионной репарации, обуславливающие гиперчувствительность к облучению и повышенный риск рака различной локализации. Сравнивая, полученные нами результаты с данными других исследований, обнаружено, что в работе Lunn R.M. с соавторами при изучении связи полиморфизма гена *XPD* в кодонах 199 (Ile>Met), 312 (Asp>Asn) и 751



*XPD* Lys751Gln в облученной и контрольной популяциях

**Рисунок 1** – Распределение генотипов по полиморфизму *XPD* Lys751Gln

**Таблица 1** – Ассоциация *XPD* Lys751Gln генотипа с индивидуальной радиочувствительностью и радиорезистентностью

Ген	Генотип	Контроль, чел (%)	Облученные, чел (%)	OR	CI (95%)	P
Кол-во человек		213	435			
XPD-751	Lys/Lys	121 (56,81)	283 (65,06)	1.42	1.01 – 1.98	0,02
	Lys/Gln	77 (36,15)	136 (31,26)	0.80	0.57 – 1.13	
	Gln/Gln	15 (7,04)	16 (3,68)	0.50	0.24 – 1.04	

(Lys>Gln) со способностью к восстановлению пострадиационных повреждений культур клеток женщин с высоким и низким риском рака молочной железы было установлено, что гомозиготы Lys751Lys имеют существенно сниженную эффективность репарации пострадиационных повреждений. В то же время, в работе W.W. Au с соавторами при облучении крови здоровых некурящих добровольцев X- и УФ-лучами было обнаружено, что XPD 751Gln ассоциирован с возрастанием уровня хроматидных разрывов. Также, в научном обзоре Мининой В.И. сообщается, что XPD 751Gln проявляет ассоциацию с высокими частотами хромосомных aberrаций, индуцированных ионизирующим излучением в условиях *in vitro*, тогда как в условиях воздействия радиации *in vivo* данные полиморфизмы не оказывают значимого эффекта [4]. В двух крупнейших исследованиях было показано, что

гомозиготный генотип Gln751Gln связан с повышенным риском развития рака легких [5].

Обобщая вышесказанное, можно заключить, что данные относительно участия исследуемого полиморфизма гена XPD в радиочувствительности и радиорезистентности неоднозначны. Возможно, это связано с этнической неоднородностью исследуемых популяций, в некоторых случаях с недостаточным объемом выборки для исследования, а также нецелесообразным представляется перенос данных, полученных в эксперименте на культурах клеток, на организм и популяцию в целом.

В ходе дальнейшей работы нами планируется проведение анализа данного полиморфизма с целью выявления возможной ассоциации между его с развитием заболеваний и уровнем хромосомных aberrаций в лимфоцитах крови людей, подвергшихся действию радиации.

#### Литература

- 1 Au W.W. et al. Use of biomarkers to characterize functions of polymorphic DNA repair genotypes //Int. J. Environ. Health. – 2004. – Vol. 207. – P. 301-313.
- 2 Goode E. L., Ulrich C. M. and Potter J. D. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk //Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. – 2002. – P.1513-1530
- 3 Yuan H., Niu Y.M., Wang R.X. et al. Association between XPD Lys751Gln polymorphism and risk of head and neck cancer: a meta-analysis // Genet. Mol. Res. -2011. – V.10(4). – P.3356-3364.
- 4 Lunn R.M. et al. XPD polymorphisms: effect on DNA repair proficiency // Carcinogenesis. – 2000. – Vol. 21. – P. 551-555.
- 5 Zhou W, Liu G, Miller DP, et al. Gene-environment interaction for the ERCC2 polymorphisms and cumulative cigarette smoking exposure in lung cancer // Cancer Res. – 2002. – Vol.62. – P.1377–1381