

УДК: 577.21: 577.2:616-006

Т.С. Балмуханов, А.О. Абайлдаев, Д.Д. Мукушкина*

Институт молекулярной биологии и биохимии имени М.А. Айтхожина, Казахстан, г. Алматы

*e-mail: dina_kawai@mail.ru

Поиск ассоциации гена FGFR2 участка rs1219648 с развитием рака молочной железы

Проведено сравнение распределения генотипов и частот аллелей гена FGFR2 (rs1219648) между больными РМЖ и контрольной группы в казахской и русской этнических группах. В отличие от ряда мировых популяций ассоциаций полиморфизма в сайте rs1219648 гена FGFR2 с раком молочной железы не выявлено ни в казахской, ни в русской этнических группах.

Ключевые слова: Рак молочной железы, гены, FGFR2, полиморфизм, популяция.

Т.С. Балмуханов, А.О. Абайлдаев, Д.Д. Мукушкина

FGFR2 геніндегі rs 1219648 ауданының

сүт безі қатерлі ісік ауруымен ассоциациясын іздестіру

Елімізде мекендейтін қазақ және орыс этникалық топтарындағы сүт безі қатерлі ісік ауруымен ауыратын және бақылау тобы арасындағы FGFR2 (rs1219648) генінің генотиптік және аллелдік таралу жиілігі жайлы салыстырмалы мәліметтер алынды. FGFR2 генінің rs1219648 ауданындағы полиморфизмінің сүт безі қатерлі ісік ауруымен ассоциациясының ерекшелігі бірқатар әлемдік популяцияларға қарағанда қазақ және орыс этникалық топтарында анықталмады.

Түйін сөздер: Сүт безі қатерлі ісік ауруы, гендер, FGFR2, полиморфизм, популяция.

T.S.Balmukhanov, A.O. Abayldaev, D.D. Mukushkina

Search association of FGFR2 gene rs1219648 area with the development of breast cancer

This study compared the distribution of genotypes and allele frequencies of gene FGFR2 (rs1219648) between breast cancer patients and the control group in the Kazakh and Russian ethnic groups. In contradistinction on a number of world populations associations of polymorphism in a site rs1219648 gene FGFR2 with breast cancer did not reveal neither in Kazakh, nor in Russian ethnic groups.

Key words: Breast cancer genes, FGFR2, polymorphism, population.

Рак молочной железы (РМЖ) является наиболее распространенной формой рака у женщин, как в развитых, так и в настоящее время, в развивающихся странах. Количество случаев РМЖ составляет 23% от общего количества онкологических заболеваний и приводило в прошлом десятилетия к приблизительно 400000 ежегодных смертельных исходов в мире.

Значительные этнические различия в распространенности генотипов и частот аллелей, являющихся маркерами онкологических заболеваний среди представителей различных рас и национальностей, являются в настоящее время общепринятым фактом. В современной молеку-

лярной эпидемиологии повышенное внимание уделяется изучению популяционных особенностей генома, его вариабельности, экспрессии генов. В Казахстане в силу исторических причин сформировался многонациональный состав населения. Исследования, направленные на поиск и выявление полиморфных маркеров генов средней и низкой пенетрантности, ассоциированных с повышением риска развития РМЖ, в основных этнических группах Казахстана проводятся впервые.

В изучении этиологии и патогенеза РМЖ значимую роль сыграло открытие генов с наличием мутаций, ассоциированных с повышен-

ным риском развития этой формы заболевания. Выделяют мутации в многочисленных генах средней и низкой пенетрантности, в частности ген *FGFR2*, перспективных для исследования по данным последних широкомасштабных полногеномных ассоциативных исследований (GWAS) и мета-анализов.

Ген рецептора фактора роста фибробластов *FGFR2* (fibroblast growth receptor 2) локализован на хромосоме 10q26.13, содержит приблизительно 116 тысяч пар нуклеотидов и его кодирующая часть включает в себя 22 экзона [1]. Гены, кодирующие соответствующие белки – рецепторы фактора роста фибробластов *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *FGFR4* расположены на четырех различных хромосомах и играют важную роль в процессах клеточной пролиферации, дифференциации, ингибирования апоптоза, ангиогенеза и миграции клеток [2].

До недавнего времени в гене *FGFR2* была идентифицирована только одна соматическая мутация (R203C) в клеточной линии РМЖ HCC1143 [3]. Позднее во втором интроне гена *FGFR2* были дополнительно обнаружены еще четыре однонуклеотидных полиморфизма: rs1219648, rs2981579, rs11200014, rs2420946, демонстрирующие высокий уровень ассоциации с РМЖ, что внесло этот ген в список генов-кандидатов, участвующих в развитии заболевания [4].

Как уже упоминалось, ген *FGFR2* кодирует трансмембранную тирозиновую киназу, которая участвует в клеточном росте, инвазивности, подвижности и ангиогенезе. Киназа, кодируемая этим геном действует также как митогенный или ангиогенный фактор, зависимый от клеточного типа и(или) микроокружения [5]. Более того, в связи с тем фактом, что *FGFR2* может трансформировать эпителиальные клетки молочной железы человека, подавление сигналов *FGFR2* может замедлять пролиферацию опухолевых клеток груди [6]. Сообщалось, также, что разнообразно сплайсированные варианты транскриптов ассоциированы с дисфункцией *FGFR2* при РМЖ и его повышенной экспрессией, наблюдаемой в клеточных линиях и тканях при РМЖ. Данные наблюдения указывают на существование тесной корреляции между мутациями в гене *FGFR2* и риском РМЖ [7].

Исследования степени ассоциации полиморфизма гена *FGFR2* с РМЖ, проведенные в различных популяциях, продемонстрировали

существование значительных различий между ними. С целью отбора из большого количества SNP именно тех вариантов, которые следует рассматривать в качестве потенциальных биомаркеров, в настоящее время проводят эпидемиологические обзоры и мета-анализы имеющихся в литературе и электронных базах данных показателей. В одном из метаисследований было выявлено три полиморфизма статистически значимо ассоциированных с риском РМЖ, в частности rs1219648, но авторы не дифференцировали анализируемые группы по этнической принадлежности [8].

Материалы и методы

В качестве объекта использованы образцы венозной крови пациенток с клинически подтвержденным диагнозом РМЖ и практически здоровых женщин без онкологических заболеваний по семейному анамнезу казахской и русской национальностей. Забор крови производится у пациентов Казахского НИИ онкологии и радиологии МЗ РК, г. Алматы и Алматинского онкологического диспансера, при информированном согласии больных. Забор образцов крови здоровых доноров проводился в Городском центре крови, г. Алматы. К настоящему моменту собрано образцов крови от пациенток с РМЖ – 312 от лиц казахской национальности, 184 – от лиц русской национальности. Контрольная группа сформирована из 190 лиц казахской национальности и 173 – русской национальности. Данные о количестве пациентов и контроля в экспериментах различаются в связи с постоянно продолжающимся сбором образцов крови пациентов и контрольных образцов. Средний возраст больных РМЖ в казахской и русской этнических группах составлял $49,58 \pm 8,70$ и $53,40 \pm 9,97$ соответственно. Контрольная группа составлена из 219 представительниц казахской и 179 – русской национальности, средний возраст составляет $49,84 \pm 6,09$ для казашек и $50,43 \pm 6,56$ для русских женщин.

Выделение геномной ДНК из лейкоцитов крови проводили с использованием наборов фирм “Quigen” и «Ахуген» (США) в соответствии с рекомендуемыми протоколами. Таг-ДНК-полимераза, маркеры молекулярной массы – рестрицированная ДНК pUC19/Kzo9, олигонуклеотидные праймеры и эндонуклеазы рестрикции получены от фирмы «СибЭнзим», Россия.

Оптимизация и отработка условий ПЦР реакции проводилась индивидуально для локуса исследуемого гена при градиентном спектре температур для подбора оптимальной температуры для каждой пары праймеров. Последовательность олигонуклеотидных праймеров подбиралась индивидуально для тестируемого участка с использованием программы Primer 3 (v.0.4.0).

Аmplификационная смесь для ПЦР анализа с Taq-полимеразой содержала 60 mM Трис-НСI (рН 8,5); 25 mM КСI; 1,5-3,0 mM MgCl₂; 0,1% Тритон X-100; 10 mM 2-меркаптоэтанола; 15 нг геномной ДНК; по 2 пМ каждого из праймеров, смесь dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) по 200 мкМ каждого, 1 ед. Taq-полимеразы.

Определение однонуклеотидных замен в локусе гена FGFR2 (rs1219648) проводили с помощью анализа полиморфизма длин рестриционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ) с использованием специфических синтезированных по заказу олигонуклеотидных праймеров и последующим расщеплением амплификата соответствующей эндонуклеазой рестрикции для распознавания сайта замены.

Для проведения ПЦР и рестриционного анализа участка rs1219648 гена FGFR2 применяли следующие условия: 95°C – 2 мин, 35 циклов (95°C – 30с, 58°C – 30с, 72°C – 30с), 72°C – 5 мин. Используются праймеры следующей нуклеотидной последовательности: 5'-CACGCCTATTTACTTGACACGC-3' – прямой и 5'-ATTTGTATGTGGTAGCTGACTTC-3' – обратный. Инкубацию с рестриктазой BstHNI проводили при температуре 50°C в течение 3 часов в рестриционной смеси, содержащей 33 mM Трис-Ас, 100 mM MgАс, 66 mM КАс, 1 mM DTT, 100мкг/мл BSA, 1 ед. фермента.

Для оценки чистоты и нативности выделенной ДНК использовали гель-электрофорез в 8% полиакриламидном геле (ПААГ). При проведении электрофореза 5 мкл препарата ДНК смешивали с 1-3 мкл буфера для нанесения (0,25% бромфеноловый синий, 0,25% ксиленицианол, 40% сахара) и подвергали электрофорезу в ТАЕ буфере при 100 В в течение 1 часа.

Продукты амплификации и последующей рестрикции анализировали методом электрофореза в 8% в полиакриламидном геле, (ТВЕ-буфер). Фрагменты разделяли при 40 мА в течение

3 часов и окрашивали бромистым этидием, с последующей визуализацией в ультрафиолетовом свете. Результаты сохраняли и анализировали в цифровом формате (гель-документирующая система Biorad, USA).

Достоверность различий в распределении генотипов и частотах аллелей рассчитывали с помощью критерия Пирсона (χ^2), наблюдаемое распределение генотипов в выборках проверяли на соответствие уравнению Харди-Вайнберга (HWE). В качестве индикатора степени связи между наблюдаемыми значениями аллелей и генотипов использовали отношение шансов (odds ratio – OR), доверительный интервал (confidence interval – CI). Точный тест Фишера был использован в случаях, когда значения частот генотипов были неравноценно распределены среди ячеек таблицы (одно из значений – менее 6). Используются программы Microsoft Excel и Statistica 2005.

Результаты и обсуждение

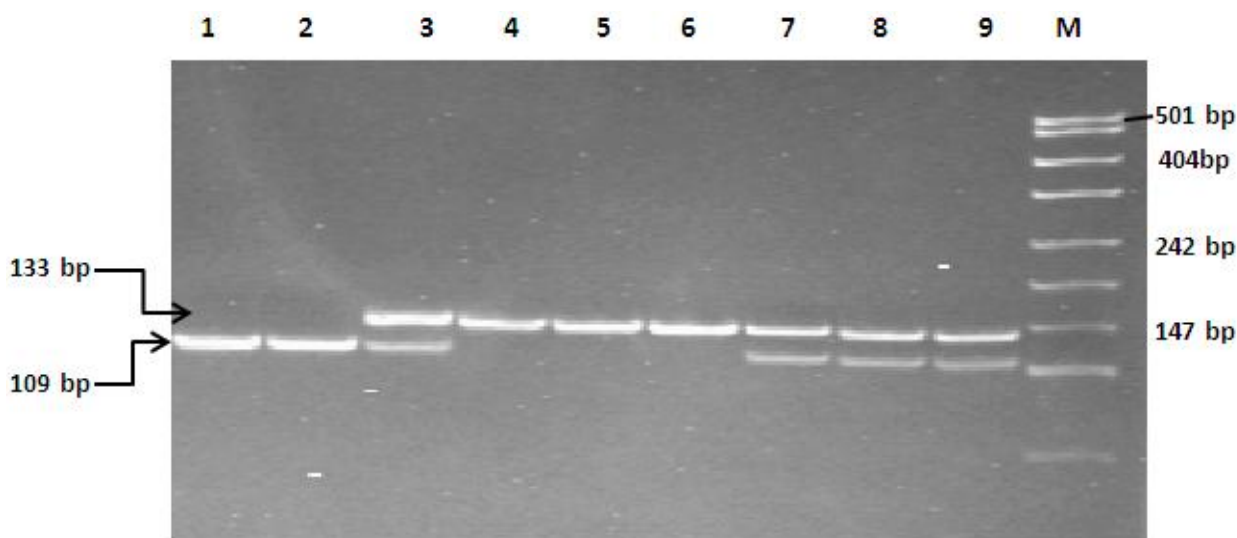
При проведенном нами тестировании полиморфизма участка rs1219648 гена FGFR2 получены результаты, представленные на рисунке 1 и обобщенные в таблицах 1 и 2.

Как следует из данных, приведенных в таблицах 1 и 2, ассоциаций полиморфизма rs1219648 гена FGFR2 с РМЖ не выявлено ни в казахской, ни в русской этнических группах. Данные по распределению генотипов и частотам аллелей в группах контроля и пациентов РМЖ в казахской и русской этнических группах укладываются в равновесие Харди-Вайнберга.

В исследовании, проведенном ранее у женщин Туниса, при тестировании полиморфизмов гена FGFR2, обнаруженных в ходе GWAS исследования, было показано, что аллель А этого полиморфизма является рисковым, имеет более высокую частоту встречаемости в группе пациентов с РМЖ и статистически достоверно ассоциирован с РМЖ [9].

В исследовании, проведенном на материале, полученном от женщин из трех различных штатов в США, была обнаружена статистически значимая ассоциация этого полиморфизма с заболеванием у лиц, принимавших после менопаузы эстроген заместительную терапию [10].

Среди американок как европейского, так и африканского происхождения полиморфизм был связан с РМЖ и рисковым являлся аллель



Дорожки - 1, 2 гомозиготы по аллелю G (генотип GG),
 дорожки 3, 7, 8, 9 – гетерозиготы (генотип AG), дорожки - 4, 5, 6 – гомозиготы по аллелю A (генотип AA),
 М – маркер молекулярной массы

Рисунок 1 – Электрофореграмма продуктов рестрикции амплифицированного фрагмента rs1219648 гена *FGFR2*

Таблица 1 – Распределение генотипов и частоты аллелей полиморфизма rs1219648 гена *FGFR2* в казахской этнической группе

Аллели/ генотипы	Частота встречаемости		OR	CI (95%)	χ^2	P
	Пациенты РМЖ n = 310	Контроль n = 187				
A	0.612	0.607	0.97	0.75 – 1.26	0.05	0.83
G	0.424	0.393	1.03	0.79 – 1.34		
AA	0.358	0.364	0.98	0.67 – 1.42	0.06	0.97
AG	0.484	0.487	0.99	0.69 – 1.42		
GG	0.158	0.153	1.07	0.64 – 1.77		

Таблица 2 – Распределение генотипов и частоты аллелей полиморфизма rs1219648 гена *FGFR2* в русской этнической группе

Аллели/ генотипы	Частота встречаемости		OR	CI (95%)	χ^2	P
	Пациенты, n = 183	Контроль, n = 170				
A	0.634	0.641	0.97	0.71 – 1.32	0.04	0.84
G	0.366	0.359	1.03	0.76 – 1.40		
AA	0.361	0.412	0.81	0.52 – 1.24	3.00	0.22
AG	0.546	0.459	1.42	0.93 – 2.16		
GG	0.093	0.129	0.69	0.35 – 1.35		

Примечание. p – достоверность различий показателей по сравнению с их значениями у здоровых доноров; χ^2 – стандартный критерий Пирсона для сравнения частот генотипов и аллелей генов; OR – отношение шансов, отражающее относительный риск развития заболевания при определенном генотипе по сравнению со здоровыми донорами с 95% доверительным интервалом (CI).

А [11]. Следует также отметить, что у американского европейского происхождения данный полиморфизм был единственным ассоциированным с РМЖ из 11 полиморфизмов, предложенных GWAS в качестве наиболее вероятных кандидатов увеличивающих риск развития РМЖ, после статистических манипуляций с выравниванием по предковому компоненту.

В популяции женщин из Турции было показано, что данный полиморфизм не связан с риском развития РМЖ. Однако отмечалось повышение количества гетерозигот в группе пациентов. Необходимо отметить, исследование

было выполнено на выборке включавшей всего 30 человек [12].

В популяции женщин Южного Китая полиморфизм в rs1219648 ассоциирован с повышением риска РМЖ по аддитивной модели наследования (модель наследования, которая сравнивает распределение частот генотипов, при степени свободы 1).

Таким образом, из результатов проведенного исследования следует, что полиморфизм в участке rs1219648 не может рассматриваться в качестве маркера РМЖ в казахской и русской этнических группах РК.

Литература

- 1 Ingersoll R.G., Paznekas W.A., Tran A.K. et al. Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2): genomic sequence and variations // *Cytogenet. Cell. Genet.* – 2001. -V. 94. – P. 121–126.
- 2 Eswarakumar V.P., Lax I., Schlessinger J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors // *Cytokine & Growth Factor Reviews* – 2005. – V. 16. – P. 139–149.
- 3 Stephens P., Edkins S., Davies H. et al. A screen of the complete protein kinase gene family identifies diverse patterns of somatic mutations in human breast cancer // *Nature Genetics.* – 2005. – V. 37. – P. 590–592.
- 4 Hunter D.J., Kraft P., Jacobs K.B., et al. A genome-wide association study identifies alleles in FGFR2 associated with risk of sporadic postmenopausal breast cancer // *Nature Genetics.* – 2007. – V. 39. – P. 870–874.
- 5 Kawase T., Matsuo K., Suzuki T., Hiraki A. FGFR2 intronic polymorphisms interact with reproductive risk factors of breast cancer: results of a case control study in Japan // *Int. J. Cancer.* – 2009. - V. 125. – P. 1946–1952.
- 6 Koziczak M., Holbro T., Hynes N.E. Blocking of FGFR signaling inhibits breast cancer cell proliferation through downregulation of D-type cyclins // *Oncogene.* -2004. – V. 23. – P. 3501–3508.
- 7 Turner N., Lambros M.B., Horlings H.M. et al. Integrative molecular profiling of triple negative breast cancers identifies amplicon drivers and potential therapeutic targets // *Oncogene.* – 2010. – V. 29. – № 14.- P.2013–2023.
- 8 Peng S., Lü B., Ruan W. et al. Genetic polymorphisms and breast cancer risk: evidence from meta-analyses, pooled analyses, and genome-wide association studies // *Breast Cancer Res. Treat.*-2011. – V. 127. – № 2. – P. 309–324.
- 9 Shan J., Mahfoudh W., Dsouza S.P., et al. Genome-Wide Association Studies (GWAS) breast cancer susceptibility loci in Arabs: susceptibility and prognostic implications in Tunisians // *Breast Cancer Res. Treat.*- 2012. - V.135.- № 3.- P. 715.
- 10 Andersen S.W., Trentham-Dietz A., Figueroa J.D., et al. Breast cancer susceptibility associated with rs1219648 (fibroblast growth factor receptor 2 and postmenopausal hormone therapy use in a population-based United States study // *Menopause.* – 2013.- V. 20.-№ 3.-P. 354–358.
- 11 Barnholtz-Sloan J.S., Raska P., Rebbeck T.R. et al. Replication of GWAS "Hits" by Race for Breast and Prostate Cancers in European Americans and African Americans // *Front. Genet.* – 2011. – V. 2. – eCollection 2011.
- 12 Bayraktar S., Thompson P.A., Yoo S.Y. et al. The relationship between eight GWAS-identified single-nucleotide polymorphisms and primary breast cancer outcomes // *Oncologist.* – 2013. – V.18.- P. 493–500.

Reference

- 1 Ingersoll R.G., Paznekas W.A., Tran A.K. et al. Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2): genomic sequence and variations // *Cytogenet. Cell. Genet.* – 2001. -V. 94. – P. 121–126.
- 2 Eswarakumar V.P., Lax I., Schlessinger J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors // *Cytokine & Growth Factor Reviews* – 2005. – V. 16. – P. 139–149.
- 3 Stephens P., Edkins S., Davies H. et al. A screen of the complete protein kinase gene family identifies diverse patterns of somatic mutations in human breast cancer // *Nature Genetics.* – 2005. – V. 37. – P. 590–592.
- 4 Hunter D.J., Kraft P., Jacobs K.B., et al. A genome-wide association study identifies alleles in FGFR2 associated with risk of sporadic postmenopausal breast cancer // *Nature Genetics.* – 2007. – V. 39. – P. 870–874.
- 5 Kawase T., Matsuo K., Suzuki T., Hiraki A. FGFR2 intronic polymorphisms interact with reproductive risk factors of breast cancer: results of a case control study in Japan // *Int. J. Cancer.* – 2009. - V. 125. – P. 1946–1952.
- 6 Koziczak M., Holbro T., Hynes N.E. Blocking of FGFR signaling inhibits breast cancer cell proliferation through downregulation of D-type cyclins // *Oncogene.* -2004. – V. 23. – P. 3501–3508.
- 7 Turner N., Lambros M.B., Horlings H.M. et al. Integrative molecular profiling of triple negative breast cancers identifies amplicon drivers and potential therapeutic targets // *Oncogene.* – 2010. – V. 29. – № 14.- P.2013–2023.

8 Peng S., Lü B., Ruan W. et al. Genetic polymorphisms and breast cancer risk: evidence from meta-analyses, pooled analyses, and genome-wide association studies // *Breast Cancer Res. Treat.*-2011. – V. 127. – № 2. – P. 309-324.

9 Shan J., Mahfoudh W., Dsouza S.P., et al. Genome-Wide Association Studies (GWAS) breast cancer susceptibility loci in Arabs: susceptibility and prognostic implications in Tunisians // *Breast Cancer Res. Treat.*- 2012.- V.135.- № 3.- P. 715.

10 Andersen S.W., Trentham-Dietz A., Figueroa J.D., et al. Breast cancer susceptibility associated with rs1219648 (fibroblast growth factor receptor 2 and postmenopausal hormone therapy use in a population-based United States study // *Menopause.* – 2013.- V. 20.-№ 3.-P. 354-358.

11 Barnholtz-Sloan J.S., Raska P., Rebbeck T.R. et al. Replication of GWAS "Hits" by Race for Breast and Prostate Cancers in European Americans and African Americans // *Front. Genet.* – 2011. – V. 2. – eCollection 2011.

12 Bayraktar S., Thompson P.A., Yoo S.Y. et al. The relationship between eight GWAS-identified single-nucleotide polymorphisms and primary breast cancer outcomes // *Oncologist.* – 2013. – V.18.- P. 493-500.