

В.Г. НИГМАТОВА, А.К. ХАНСЕИТОВА, С.П. ВАРЧЕНКО,
Т.Н. МИРОШНИК, Т.С. БАЛМУХАНОВ, Н.А. АЙТХОЖИНА

(РГП «Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А.Айтхожина»КН МОН РК,
Алматы)

**ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ЛОКУСА rs2420946 ГЕНА *FGFR2*
ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
В ОСНОВНЫХ ЭТНИЧЕСКИХ ГРУППАХ КАЗАХСТАНА**

Аннотация

Проведено сравнение распределения генотипов и частот аллелей в полиморфном участке rs2420946 гена *FGFR2* между пациентами с раком молочной железы (n=291) и контролем (n=201) в казахской и русской этнических группах с использованием при статистической обработке результатов различных моделей наследования. В русской этнической группе значимых различий в распределении генотипов и частотах аллелей между пациентами с диагнозом рак молочной железы (РМЖ) и контролем не выявлено. В казахской группе при использовании рецессивной модели наследования обнаружены статистически достоверные отличия ($\chi^2=4.10$; $P=0.04$) в распределении генотипов между больными и контролем и значения OR для рискованного генотипа CC составляло 1.65 (CI 95%: 1.01 – 2.69). Анализ полученных результатов, проведенный с применением доминантной модели, не выявил статистически достоверных различий в казахской группе. Распределение частот генотипов в контрольных казахской и русской этнических группах укладывалось в уравнение Харди-Вайнберга. В выборке пациентов казахской национальности обнаружено теоретически объяснимое отклонение распределения генотипов от уравнения Харди-Вайнберга ($\chi^2=6.74$; $P=0.009$).

Ключевые слова: рак молочной железы, полиморфизм, ген *FGFR2*.

Тірек сөздер: сүт безі ісігі, полиморфизм, *FGFR2* гені.

Key words: breastcancer, polymorphism, *FGFR2* gene.

В настоящее время в мире интенсивно проводятся исследования, направленные на установление связи между онкологическими заболеваниями и индивидуальными особенностями пациентов, обусловленных структурной организацией их геномов. Одним из подходов к установлению такой связи является поиск и выявление достоверных

ассоциаций полиморфных изменений генома с развитием заболевания. Группа генов, кодирующих рецепторы факторов роста фибробластов (fibroblastgrowthreceptor - FGFR), привлекают внимание исследователей в связи с их потенциальной возможностью служить мишенью для терапевтического воздействия у пациентов страдающих раком молочной железы (РМЖ). Так как тирозинкиназные рецепторы, к которым относится FGFR, играют важную роль в процессах клеточной пролиферации, дифференциации, апоптоза и ангиогенеза структурные изменения в генах этих рецепторах могут влиять на развитие опухолей.

Ген, кодирующий *FGFR2*, расположен на хромосоме 10q и является геном супрессором опухоли, экспрессия которого значительно повышена в 5-10% опухолевых клеточных линий [1]. Помимо этого, в опухолях первичного РМЖ обнаружено увеличение копийности этого гена [2]. Сплайсинговые варианты мРНК гена *FGFR2* кодируют различные трансляционные продукты, которые участвуют в процессах сигнальной трансдукции и трансформации в клеточных линиях опухоли. В 2007 году было проведено полногеномное исследование ассоциаций GWAS (genome wide association study) среди женщин европейских популяций, которое из более чем из пятисот тестированных однонуклеотидных полиморфизмов выявило четыре однонуклеотидных полиморфизма (SNP -single nucleotide polymorphism) во втором интроне гена *FGFR2*, которые обладали высоким уровнем ассоциации с РМЖ [3].

В связи с тем, что степень ассоциации различных полиморфизмов с заболеванием, обнаруженная в результате полногеномного скрининга, значительно варьирует, вплоть до полного её отсутствия или, в отдельных случаях, даже противоположного действия для подтверждения и определения их диагностической ценности SNP проводятся исследования по типу «случай-контроль» (“case-control”). В настоящей работе представлены результаты исследования ассоциации полиморфизма C/Тв участке rs2420946 второго интрона гена *FGFR2*с РМЖ в казахской и русской этнических группах Казахстана.

Материалы и методы

В качестве объекта использована цельная венозная кровь 201 пациента с клинически подтвержденным диагнозом РМЖ и 291 образец крови практически здоровых доноров без онкологических заболеваний по семейному анамнезу. Средний возраст больных РМЖ в казахской группе составил 47.7 ± 11.5 лет, в русской - 53.2 ± 11.6 года; средний возраст в контрольной казахской группе - 47.9 ± 10.5 и 47.6 ± 10.8 лет в русской.

Выделение ДНК проводили с использованием китов производства «Ахуген», США. При проведении амплификации и электрофореза использованы TaqDNA-полимераза и маркер молекулярной массы ДНК pUC19/Kzo9 производства «СибЭнзим», Россия.

Полиморфизм rs2420946 гена *FGFR2* исследовали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) с использованием в реакции олигонуклеотидных праймеров следующего состава: F: 5'-AAGCCCTCAGACGACAGAAA - 3', R: 5'-CTGCTCAACCTGGGATCTGT- 3'. Амплификацию проводили в следующем режиме: начальная денатурация 94°C- 5 мин, 30

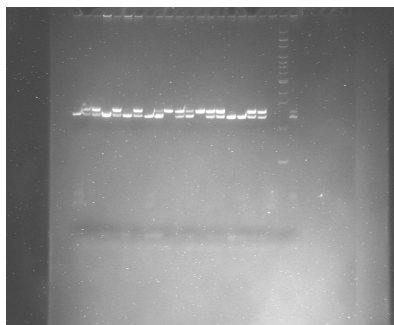
циклов в следующем режиме (94°C - 1 мин, 63°C- 1 мин, 72°C - 1 мин), заключительная элонгация 72°C, 7 мин.

Достоверность различий в распределении генотипов и частотах аллелей рассчитывали с помощью критерия Пирсона (χ^2), 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). При обработке результатов использованы программы Microsoft Excel и Statistica 2007.

Результаты и обсуждение

В представленном исследовании, проведенном методом «случай-контроль» определено распределение генотипов и частоты аллелей в полиморфном участке rs2420946 гена *FGFR2* в группе пациентов со sporadическим РМЖ и в группе здоровых доноров.

В результате ПЦР образуется амплифицированный фрагмент второго интрона гена *FGFR2* размером 269 пар нуклеотидов. При наличии аллеля С в изучаемом участке присутствует сайт рестрикции для рестриктазы *AspLEI* и после её проведения образуются фрагменты с размерами 244 и 25 пар нуклеотидов (п.н.). Аллелю Т (отсутствие сайта рестрикции) соответствует фрагмент размером 269 п.н. (Рисунок 1).



Дорожки 1, 4 – гомозиготы по аллелю Т (генотип ТТ), дорожки 2, 3, 5, 6, 9, 10 – гетерозиготы (генотип ТС), дорожки 7, 8 – гомозиготы по аллелю С (генотип СС), М – маркер молекулярной массы

Рисунок 1 - Продукты рестрикции фрагмента гена *FGFR2*

Результаты определения частоты аллелей и распределения генотипов в изучаемом участке в казахской этнической группе приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Распределение генотипов и частоты аллелей полиморфизма rs2420946 гена *FGFR2* в казахской этнической группе

Аллели/ генотипы	Частота встречаемости		OR	CI (95%)	χ^2	P
	Пациенты PMЖ n = 138	Контроль n = 168				
C	0.612	0.554	1.27	0.92 – 1.76	2.15	0.14
T	0.388	0.446	0.79	0.57 – 1.09		
CC	0.370	0.262	1.65	1.01 – 2.69	4.22	0.12
TC	0.486	0.583	0.67	0.43 – 1.06		
TT	0.145	0.155	0.93	0.49 – 1.74		

Достоверных различий в распределении аллелей и генотипов между больными и здоровыми лицами в казахской этнической группе обнаружено не было. Статистическая обработка результатов, проведенная с использованием доминантной модели наследования, не выявила достоверных различий в распределении генотипов и частотах аллелей, но при использовании в расчетах рецессивной модели наблюдались статистически достоверные различия в распределении генотипов ($\chi^2=4.10$; $P=0.04$). При этом значение отношения шансов (oddsratio–OR) для рисковогенотипа CC составило 1.65 (95% при CI 1.01 – 2.69). Распределения генотипов в казахских группах больных и здоровых укладывалось в уравнение Харди-Вайнберга.

Данные, полученные при аналогичном тестировании в русской этнической группе, приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Распределение частот аллелей и генотипов полиморфизма rs 2420946 гена *FGFR2* в русской этнической группе

Аллели/ генотипы	Частота встречаемости		OR	CI (95%)	χ^2	P
	Пациенты PMЖ n = 63	Контроль n = 121				
C	0.548	0.591	0.84	0.54 – 1.29	0.64	0.43 (0.064)
T	0.452	0.409	1.19	0.77 – 1.84		
CC	0.190	0.306	0.53	0.26 –	3.76	0.15(0.164)

				1.12		
TC	0.714	0.570	1.88	0.98 – 3.63		
TT	0.095	0.124	0.74	0.27 – 2.02		
*В скобках указаны значения P после коррекции по тесту Фишера.						

В русской этнической группе контрольная выборка укладывалась в уравнение Харди-Вайнберга ($\chi^2 = 1.81$; $P=0.18$), но в выборке пациентов было обнаружено достоверное отклонение в распределении частот генотипов от уравнения Харди-Вайнберга ($\chi^2 = 6.74$; $P=0.009$). Использование для обработки результатов как доминантной, так и рецессивной модели наследования не выявило в данной группе статистически значимых различий.

В масштабном мета-исследовании, осуществленном в 2013 году, было показано, что rs2420946 наряду с другими полиморфизмами является рисковым фактором для развития РМЖ [4]. Однако степень его ассоциации с заболеванием является различной в зависимости от принадлежности к европейской, азиатской или африканской популяции [4]. Ранее, в комбинированном исследовании, выполненном с использованием мета-анализа, анализ пула и полногеномного сканирования также была выявлена ассоциация сайта rs2420946 с риском возникновения РМЖ, наряду с двумя другими полиморфизмами гена *FGFR2*- rs2981582, rs1219648, но авторы, к сожалению, не дифференцировали изученные группы по этнической принадлежности [5].

Полученные нами данные не выявили популяционных особенностей в распределении частот аллелей и генотипов по данному полиморфизму в казахской и русской этнических группах Казахстана.

Ген *FGFR2* включен в эстроген-зависимый карциногенез, наиболее выраженная ассоциация этого полиморфизма с заболеванием проявляется в эстроген-позитивных опухолях РМЖ, в которых его экспрессия повышена [4].

Наиболее выраженные ассоциации (величины P не превышают 0,01) четырех полиморфных вариантов гена *FGFR2*, включая полиморфизм в участке rs2420946 с РМЖ продемонстрированы в еврейской популяции Израиля, в то время как в арабской популяции той же страны данные ассоциации представлены лишь в виде тренда [6].

Полученные в результате приведенного исследования данные указывают на то, что использование в предиктивных целях полиморфных вариантов, выявленных в различных мировых популяциях, требует обязательного тестирования их частот в конкретных этнических группах заключение о возможности его использования в качестве маркера РМЖ в основных этнических группах Казахстана можно будет сделать при условии включения в анализ дополнительных параметров, включая, в частности, гормональный статус.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Moffa A.B., Tannheimer S.L., Ethier S.P. Transforming potential of alternatively spliced variants of fibroblast growth factor receptor 2 in human mammary epithelial cells // Mol. Cancer Res.2004.V. 2(11).P.643-652.
- 2 Kadota M., Sato M., Duncan B. et al Identification of novel gene amplifications in breast cancer and coexistence of gene amplification with an activating mutation of PIK3CA// Cancer Research. 2009.V. 69. P.7357–7365.
- 3 [Hunter D.J., Kraft P., Jacobs K.B., et al. A genome-wide association study identifies alleles in FGFR2 associated with risk of sporadicpostmenopausal breast cancer // Nat Genet.2007. V.39\(7\). P.870-874.](#)
- 4 Wang H., Yang Z., Zhang H. Assessing interactions between the associations of fibroblast growth factor receptor 2 common genetic variants and hormone receptor status with breast cancer risk // Breast Cancer Res Treat. 2013. V.137(2). P.511-522.
- 5 Peng S., L? 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.
- 6 Raskin L., Pinchev M., Arad C. et a.lFGFR2 is a Breast Cancer Susceptibility Gene in Jewish and Arab Israeli Populations // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.2008.V.17.P.1060-1065.

REFERENCES

- 1 Moffa A.B., Tannheimer S.L., Ethier S.P. Transforming potential of alternatively spliced variants of fibroblast growth factor receptor 2 in human mammary epithelial cells // Mol. Cancer Res.2004.V. 2(11).P.643-652.
- 2 Kadota M., Sato M., Duncan B. et al Identification of novel gene amplifications in breast cancer and coexistence of gene amplification with an activating mutation of PIK3CA// Cancer Research. 2009.V. 69. P.7357–7365.
- 3 [Hunter D.J., Kraft P., Jacobs K.B., et al. A genome-wide association study identifies alleles in FGFR2 associated with risk of sporadicpostmenopausal breast cancer // Nat Genet.2007. V.39\(7\). P.870-874.](#)
- 4 Wang H., Yang Z., Zhang H. Assessing interactions between the associations of fibroblast growth factor receptor 2 common genetic variants and hormone receptor status with breast cancer risk // Breast Cancer Res Treat. 2013. V.137(2). P.511-522.
- 5 Peng S., L? 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.
- 6 Raskin L., Pinchev M., Arad C. et a.lFGFR2 is a Breast Cancer Susceptibility Gene in Jewish and Arab Israeli Populations // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.2008.V.17.P.1060-1065

Резюме

*Нығматова В.Г., Хансейітова А.К., Варченко С. П., Мирошник Т.Н., Балмұханов Т.С.,
Айтқожина Н.Ә.*

(РМК «М.Ә.Айтқожин атындағы Молекулалық биология және биохимия институты»

ҒК БҒМ, Алматы)

ҚАЗАҚСТАНДАҒЫ НЕГІЗГІ ЭТНИКАЛЫҚ ТОПТАРДЫҢ СҮТ БЕЗІ ІСІГІ КЕЗІНДЕГІ FGFR2 ГЕНІНІҢrs2420946 ЛОКУСЫНЫҢ ВАРИАБЕЛЬДІЛІГІ

Сүт безі ісігіне шалдыққан (n=291) және бақылау (n=201) орыс және қазақ этникалық топтарының FGFR2 генінің rs2420946 полиморфты ауданында аллельдермен генотиптердің таралу жиіліктерін тұқымқуалаушылық үлгілерінің әр түрлі статистикалық өңдеулерін пайдалана отырып салыстырмалы түрде зерттелді. Орыс этникалық тобында бақылау топпен СБҚІ шалдыққан науқастар арасында аллельдер мен генотиптердің таралуы бойынша айтарлықтай айырмашылықтар анықталмады. Қазақ тобында тұқымқуалаушылықтың рецессивті үлгісін пайдаланғанда СБҚІ шалдыққан және бақылау топтары генотиптердің таралуы бойынша айқын айырмашылықтар анықталды ($\chi^2=4.10$; $P=0.04$) және СС тәуекел генотипінің OR мәні 1.65 (CI 95%: 1.01 – 2.69) тең болды. Доминантты үлгіні пайдаланғанда қазақ тобында статистикалық айқын айырмашылық анықталмады. Қазақ және орыс бақылау топтарындағы генотиптерінің таралуы Харди-Вайнберг шегіне сәйкес болды. Теориялық тұрғыдан түсіндірмесі бар қазақ ұлтты пациенттердің таңдамасындағы генотиптердің таралуының Харди-Вайнберг ($\chi^2 =6.74$; $P=0.009$) шегінен ауытқуы анықталды.

Тірек сөздер: сүт безі ісігі, полиморфизм, *FGFR2* гені.

Summary

*Nigmatova V. G., Hanseitova A. K., Varschenko S. P., Miroshchnik T. N., Balmukhanov T.S.,
Aitkhozhina N. A.*

(M. A. Aitkhozhin Institute of Molecular Biology and BiochemistryThe Committee of Science,
the Ministry of Education and Science Republic of Kazakhstan, Almaty)

VARIABILITY OF rs2420946 LOCUS OF FGFR2 GENE IN BREAST CANCER IN THE MAJOR ETHNIC GROUPS IN KAZAKHSTAN

A comparison of the distribution of genotypes and allele frequencies at a polymorphic site of rs2320946 of FGFR2 gene between patients with breast cancer (n = 291) and control (n=201) in

the Kazakh and Russian ethnic groups using the statistical of different models of inheritance for the analysis of the results was carried out. In the Russian ethnic group, no significant differences in the distribution of genotypes and allele frequencies between patients with a diagnosis of breast cancer and control were identified. In the Kazakh group using a recessive inheritance model statistically significant differences ($\chi^2=4.10$; $P=0.04$) in the distribution of genotypes between patients and controls were found. The values of odds ratio (OR) for the risk CC genotype was 1.65 (CI 95%: 1.01 - 2.69). Analysis of the results, carried out with the use of the dominant model revealed no statistically significant differences in the Kazakh group. The distribution of genotype frequencies in the Kazakh and Russian ethnic groups fit into the Hardy - Weinberg equation. In a sample of Kazakh patients theoretically explainable deviation of the distribution of genotypes from the Hardy - Weinberg equation ($\chi^2 =6.74$; $P=0.009$) was identified.

Key words: breast cancer, polymorphism, *FGFR2* gene.

Поступила 24.10.2013 г.