

УДК 618.19-006.6-06:575

В. М. Запорожан, В. Г. Дубініна, В. В. Бубнов, Р. П. Ромак

## ШВИДКИЙ І НАДІЙНИЙ ТЕСТ ДЛЯ ТИПУВАННЯ ПОЛІМОРФІЗМІВ У ГЕНАХ *TOX3*, *SLC4A7*, *MAP3K1* І *FGFR2*, ПОВ'ЯЗАНИХ ІЗ РИЗИКОМ РОЗВИТКУ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ, МЕТОДОМ ПІРОСЕКВЕНУВАННЯ

Одеський національний медичний університет, Одеса, Україна

УДК 618.19-006.6-06:575

В. Н. Запорожан, В. Г. Дубинина, В. В. Бубнов, Р. П. Ромак  
БЫСТРЫЙ И НАДЕЖНЫЙ ТЕСТ ДЛЯ ТИПИРОВАНИЯ ПОЛИМОРФИЗМОВ В ГЕНАХ *TOX3*, *SLC4A7*, *MAP3K1* И *FGFR2*, СВЯЗАННЫХ С РИСКОМ РАЗВИТИЯ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, МЕТОДОМ ПИРОСЕКВЕНИРОВАНИЯ

*Одесский национальный медицинский университет, Одесса, Украина*

Данная статья посвящена разработке условий генотипирования полиморфизмов в генах *TOX3*, *SLC4A7*, *MAP3K1* и *FGFR2* методом пиросеквенирования и использования его для выявления предрасположенности к развитию спорадического рака молочной железы у женщин. В результате проведенного исследования установлено повышение частоты встречаемости полиморфизма TT (Rs4973768) в гене *SLC4A7* у больных раком молочной железы. Отношение шансов риска развития рака молочной железы для этого гена составляет 1,89 (ДИ = 1,01–3,397;  $p \leq 0,047$ ), относительный риск 1,7 ( $p \leq 0,049$ ). Отношение шансов для полиморфизма Rs3803662 составило 1,49, для Rs889312 — 1,59 и для Rs2981582 — 1,29. Предложенный метод анализа полиморфизмов в генах *TOX3*, *SLC4A7*, *MAP3K1* и *FGFR2* с помощью технологий пиросеквенирования позволяет быстро проводить анализ аллельных вариантов полиморфизмов и может быть использован при оценке риска развития спорадического рака молочной железы.

**Ключевые слова:** полиморфизм, ДНК, пиросеквенирование, рак молочной железы.

UDC 618.19-006.6-06:575

V. M. Zaporozhan, V. G. Dubinina, V. V. Bubnov, R. P. Romak  
FAST AND RELIABLE TEST FOR TYPING POLYMORPHISMS IN GENES *TOX3*, *SLC4A7*, *MAP3K1* AND *FGFR2*, CONNECTED WITH THE RISK OF BREAST CANCER DEVELOPMENT WITH PYROSEQUENCING METHOD

*The Odessa State Medical University, Odessa, Ukraine*

**Background.** Search for markers of classification of patients with high or low risk of disease development is the most important task of the molecular epidemiology. The prognostication of risk of some illnesses can be fulfilled with the help of classical risks factors, such as index of body weight, level of lipids, smoking, family history and genetic factors (polymorphism in genes BRCA1 and BRCA2 when talking about inherited breast carcinoma) etc. But these findings are not enough for the prognostication of risk of sporadic breast cancer. Occurrence of research with full genomic analysis of polymorphism on DNA microchips allowed to reveal more than 60 new polymorphisms, which can be potential markers of breast cancer development. Some of such allelic variants revealed during this research were polymorphisms in genes *TOX3*, *SLC4A7*, *MAP3K1* and *FGFR2*.

**Aim.** This article is devoted to development of conditions of polymorphisms genotyping in genes *TOX3*, *SLC4A7*, *MAP3K1* and *FGFR2* by the pyrosequencing method and using it for detection of predisposition to sporadic breast cancer development in women.

**Methods and results.** As a result of conducted research there was revealed increase of polymorphism TT (Rs4973768) frequency in gene *SLC4A7* in patients suffering from breast cancer. The ratio of chances of the risk of breast cancer development for this gene comprises 1.89 (CI = 1.01–3.397;  $p \leq 0.047$ ), a relative risk 1.7 ( $p \leq 0.049$ ). Ratio of chances for polymorphism Rs3803662 was 1.49, for Rs889312 — 1.59 and for Rs2981582 — 1.29.

**Conclusions.** The proposed method of analysis of polymorphisms in genes *TOX3*, *SLC4A7*, *MAP3K1* and *FGFR2* with the help of pyrosequencing technologies allows to rapidly conduct analysis of allelic variants of polymorphisms and can be used while estimating the risk of sporadic breast cancer.

**Key words:** polymorphism, DNA, pyrosequencing, breast cancer.

У сучасній медицині тривають радикальні зміни. Одна з таких змін — перенесення акценту з діагностики та лікуван-

ня захворювання на профілактичну медицину. Генетична діагностика — це порівняно нова і дуже важлива галузь

досліджень у медицині. Невеликі зміни в ДНК, відомі як одиничні нуклеотидні поліморфізми (SNP), можуть відігравати важ-



ливу роль у розвитку мультифакторних хвороб, а також резистентності до ліків, в епігенетиці (наприклад, мутації, що не кодують РНК) тощо. Сьогодні виявлено більше 60 поліморфізмів у різних генах, що пов'язані з ризиком розвитку раку молочної залози [1]. Валідовано 11 поліморфізмів, пов'язаних з ризиком розвитку раку молочної залози, і один у гені *TOX3*, пов'язаний з виживаністю хворих на рак молочної залози [2]. Скринінговий повногеномний аналіз поліморфізмів проводили за допомогою технології ДНК-мікрочипів (GWAS-повногеномні дослідження асоціацій) [3; 4] або за допомогою нової технології секвенування — next generation sequencing. З бази даних GWAS були відібрані чотири поліморфізми в чотирьох генах *TOX3*, *SLC4A7*, *MAP3K1* та *FGFR2*, які в наших дослідженнях показали зміну експресії при аденокарциномі молочної залози [5]. Три гени — *SLC4A7*, *MAP3K1* та *FGFR2* — показали підвищення експресії при наявності естроген-позитивного раку молочної залози, а експресія гена *TOX3* була підвищена у разі естроген-негативного раку молочної залози. Валідацію отриманих даних у різних дослідженнях проводили за допомогою технологій TagMan Real-time PCR, плавлення високого розділення (HRMA — High resolution melt analysis) та ін. [7]. Вивчення зв'язку поліморфізмів, виявлених у повногеномних дослідженнях, з ризиком розвитку раку молочної залози можна проводити також за допомогою технології піросеквенування. У даній роботі запропоновано аналіз поліморфізмів у генах *TOX3*, *SLC4A7*, *MAP3K1* та *FGFR2* методом піросеквенування і проведено генотипування цих полімор-

фізмів у хворих на рак молочної залози.

**Мета** дослідження полягала у такому:

1) розробка методу аналізу поліморфізмів у генах *TOX3*, *SLC4A7*, *MAP3K1* й *FGFR2* за допомогою технології піросеквенування;

2) вивчення внеску цих поліморфізмів у ризик розвитку спорадичного раку молочної залози.

### Матеріали та методи дослідження

Взяття крові проводили у пацієнок, хворих на рак молочної залози, та у здорових жінок. Вік жінок, відібраних для аналізу, становив 40–52 роки. Загалом були проаналізовані 102 проби крові, взяті у хворих на аденокарциному молочної залози, і 89 проб від здорових жінок, у яких не було захворювань молочної залози. Виділяли ДНК з крові за допомогою наборів GeneJET™ PCR Purification Kit згідно з протоколом (Fermentas). Виділену ДНК зберігали при температурі -20 °C. За допомогою PSQ Assay Design software здійснювався дизайн праймерів для аналізу поліморфізму. Праймери синтезовані фірмою Metabion Inter-

national AG (Німеччина). З метою уніфікації ампліфікації специфічних ділянок ДНК різних генів її проводили методом Touch-Down ПЛП з HotStartTag DNA Polymerase з використанням набору HotStarTaq Plus Master Mix (Qiagen) та 10 пкмоль специфічних праймерів для аналізованих SNP досліджуваних генів: 95 °C 15 хв; 7 циклів — 95 °C 35 с, 62 °C 35 с зі зниженням температури на 1,0 °C на цикл, 72 °C 45 с; 35 циклів — 95 °C 30 с; 55 °C 30 с, 72 °C 45 с; 72 °C 10 хв на термоциклері MJR.

Аналіз SNP був проведений методом піросеквенування з використанням набору PyroMark-Gold Q96 Reagents фірми Qiagen та 0,3 мМ специфічних секвенуючих праймерів до досліджуваних SNP згідно з методикою піросеквенування (Qiagen). Аналіз поліморфізму проводили на приладі PyroMark Q96 MA. Статистичний аналіз даних здійснювали за допомогою програми MedCalc software (табл. 1).

### Результати дослідження та їх обговорення

Для аналізу поліморфізму в генах, пов'язаних зі схильністю до раку молочної залози, були взяті SNP з бази даних щодо

Таблиця 1

Праймери для ампліфікації та секвенування

SNP	Праймери
<i>TOX3</i> Rs3803662	F1. CTCCTTAATGCCTCTATAGCTGTC R1. Біотин-GGGGTCAGTCCACAGTTTATT-SEQUENCING S1 TTAATGCCTCTATAGCTGTC Sequence to analyze [C/T]CTT
<i>FGFR2</i> Rs2981528	F1. ACGGCAGATCCCAGCACT R1. Біотин-TGCGGGTTCCTAAAGCCAG SEQUENCING S1 GCCACTTAATGAACCTGT Sequence to analyze TTG[C/T]
<i>MAP3K1</i> Rs889312	F1 ACACAAGTCAGGCCCCATT R1 TTTATGGGAAGGAGTCGTTGAG Sequencing Primer TAGTCTCTTAATTTGCACAT Sequence to analyze [A/G]ATG
<i>SLC4A7</i> Rs4973768	F1 CACTGTCTCTCAATGAATGCTATC R1 CTGGTTTCTGCTTTCTTTTGACTA Sequencing Primer CTGGTTTCTGCTTTCTTTTGACTA Sequence to analyze AAT[C/T]



повногеномного аналізу SNP на мікрочипах (GWAS, [www.gwas-central.org](http://www.gwas-central.org)). Були відібрані 4 SNP, найбільш тісно пов'язані з ризиком розвитку раку молочної залози за даними GWAS. Відібрані SNP локалізувалися в інтронній або кодуєчій ділянках генів. На рис. 1 показано дизайн секвенування відібраних поліморфізмів: стрілками вказано напрямок секвенування; літери, виділені закресленням, означають SNP, підкресленням — специфічні регіони для секвенування; положення секвенуючого праймера і сам праймер позначені великими літерами.

Для генів *MAP3K1* і *TOX3* досліджували поліморфізми М (А/С) і Y(С/Т) відповідно знаходяться на старті секвенування, а для гена *FGFR2* — через 4 нуклеотиди. Положення секвенуючих праймерів і старт секвенування для цих генів починається з 5' кінця ДНК. Таким чином, для гена *TOX3* послідовність при секвенуванні читатиметься як С/ТСТТ, для гена *MAP3K1* — А/САТГ. Для гена *SLC4A7* секвенуючий праймер знаходиться на комплементарному ланцюзі, тому секвенування буде починатися з 3' кінця амплікона та комплементарно першого ланцюга ДНК. Поліморфізм при цьому читатиметься не як Y (С/Т), а як R (А/Г). Послідовність при секвенуванні читатиметься як ТТА А/Г.

Оскільки внесок гетерозиготних варіантів поліморфізмів у схильність до раку молочної залози у разі спонтанного раку дуже низький, у даній статті цей варіант поліморфізму не враховувався. На рис. 2 показано піросеквенування *Rs4973768* (*SLC4A7*): на рис. 2, а — гомозиготний поліморфізм G/G; на рис. 2, б — гомозиготний поліморфізм А/А. Подвійний сигнал у положенні Т свідчить про

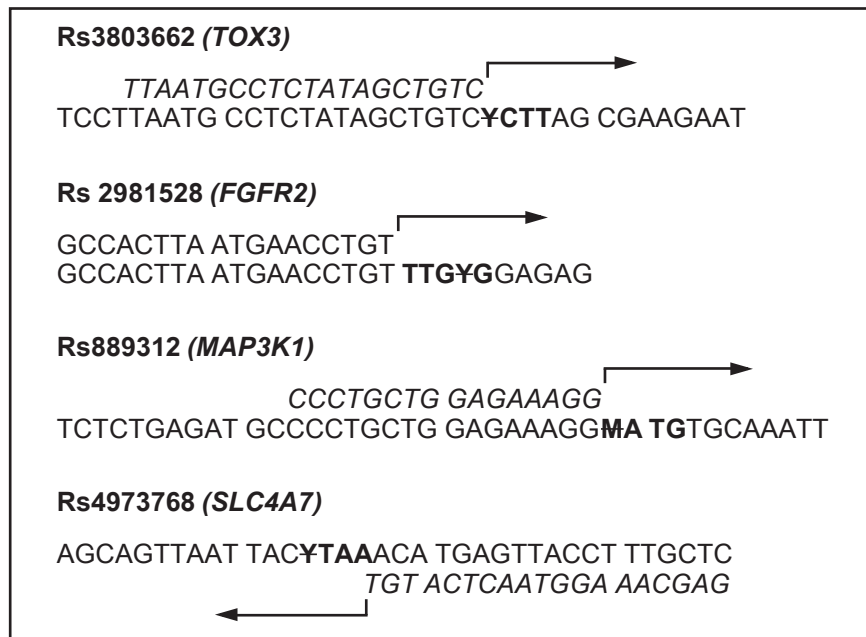


Рис. 1. Дизайн секвенування відібраних поліморфізмів

вбудовування двох нуклеотидів Т. Подвійний сигнал (див. рис. 2, а) у положенні G свідчить про те, що є гомозиготний поліморфізм G і наступний G нуклеотид у цьому ж ланцюгу. На рис. 2, б видно подвійний сигнал у положенні А, тобто цей зразок несе гомозиготний поліморфізм А/А (або алель А) і наступний нуклеотид А у цьому ж ланцюгу. На рис. 3 показано генотипування полімор-

фізму *Rs2981528* у гені *FGFR2*: на рис. 3, а є гомозиготний поліморфізм С/С (відсутній нуклеотид Т), а на рис. 3, б — гомозиготний поліморфізм Т/Т. Пірограма для поліморфізму *Rs889312* (ген *MAP3K1*) показана на рис. 4. Даний SNP має алелі А/С: на рис. 4, а показано гомозиготний алель С, а на рис. 4, б — гомозиготний алель А. Для алеля А величина екстинкції удвічі більша за

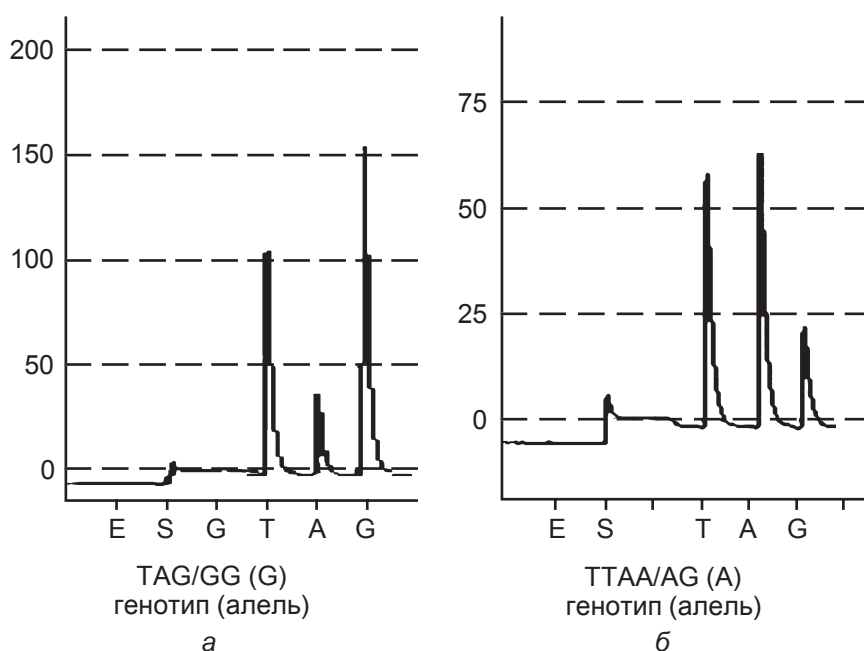


Рис. 2. Генотипування поліморфізму *Rs4973768* (*SLC4A7*) (а, б)

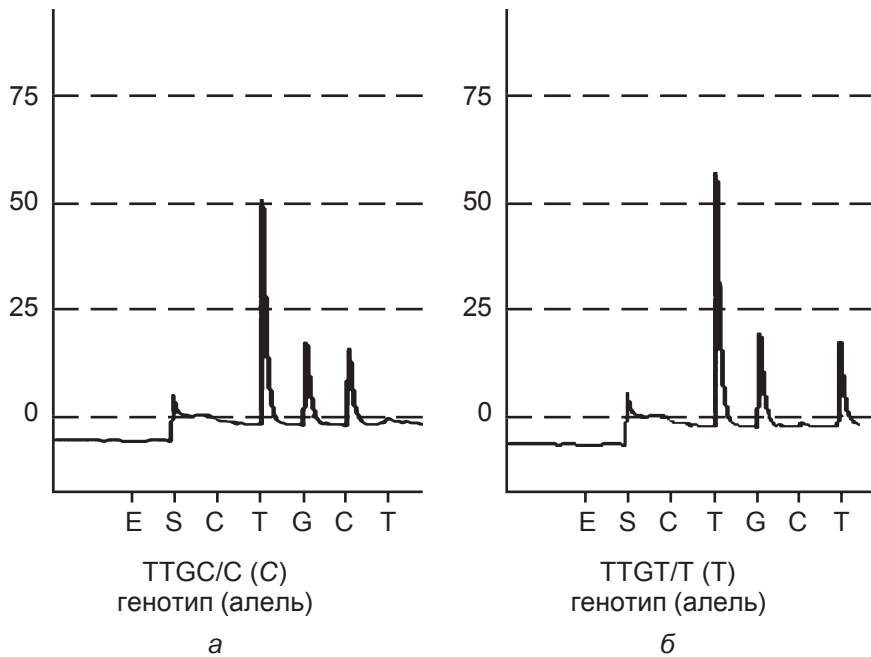


Рис. 3. Генотипування поліморфізму Rs2981528 (*FGFR2*) (а, б)

інші піки, що пов'язано з тандемним повтором AA в аналізованій послідовності цього гена. Пірограма поліморфізму C/T Rs3803662 (*TOX3*) показана на рис. 5: гомозиготний поліморфізм CC наведено на рис. 5, а, а гомозиготний поліморфізм TT — на рис. 5, б. Спостерігається відсутність включення нуклеотиду Т і подвійне включення нуклеотиду С при піросеквенуванні, що

показує наявність С-алеля, тимчасом як на рис. 5, б помітно включення нуклеотиду Т у процесі синтезу ланцюга ДНК і наявність гомозиготного поліморфізму Т.

Результати, отримані при генотипуванні обраних поліморфізмів Rs12443621 (*TOX3*), Rs4973768 (*SLC4A7*), Rs2981528 (*FGFR2*) та Rs889312 (*MAP3K1*) у хворих на рак молочної залози, порівняно зі здоровими жін-

ками, подано у табл. 2. Як видно з табл. 2, Т-алель гена *SLC4A7* вірогідно частіше (відношення шансів = 1,89; ДІ = 1,01–3,971;  $p \leq 0,047$ ) виявляється у жінок з аденокарциномою молочної залози, ніж у здорових жінок. Відносний ризик Т-алеля Rs4973768 становить 1,7 з вірогідністю  $p \leq 0,049$ . Для Т-алеля гена *TOX3* відносний ризик сягав 1,4, відношення шансів — 1,49 (0,7–3,061;  $p \leq 0,23$ ). Генотип ризику ТТ гена *FGFR2* в 1,29 разу частіше трапляється у жінок, хворих на рак молочної залози, порівняно з контрольною групою. І останній «мутантний» генотип — СС гена *MAP3K1* (Rs889312) — також частіше виявляється у хворих на рак молочної залози (в 1,59 разу, 0,749–3,412;  $p \geq 0,26$ ), при цьому відносний ризик цього генотипу становив 1,5. Таким чином, Т-алель гена *SLC4A7* вірогідно частіше трапляється у хворих на рак молочної залози, причому ці зміни мають вірогідний характер, відношення шансів решти досліджуваних поліморфізмів були невірогідними. Ген *SLC4A7* відповідає за підтримку внутрішньоклітинного рН. Припускається, що даний поліморфізм може впливати на транскрипційну активність гена *SLC4A7* [6]. Сьогодні значення цього гена у розвитку раку молочної залози не вивчене. Ген *TOX3* — транскрипційний коактиватор Р300/СВР транскрипційного комплексу — пригнічує апоптоз, стимулює транскрипцію естроген-респонсивних промоторів і гена *BCL2*. Ген *FGFR2* — рецептор фактора росту фібробластів — відіграє важливу роль у регуляції клітинної проліферації, диференціюванні, міграції та апоптозу, а також у регуляції ембріонального розвитку. Ген *MAP3K1*, мітоген-активована

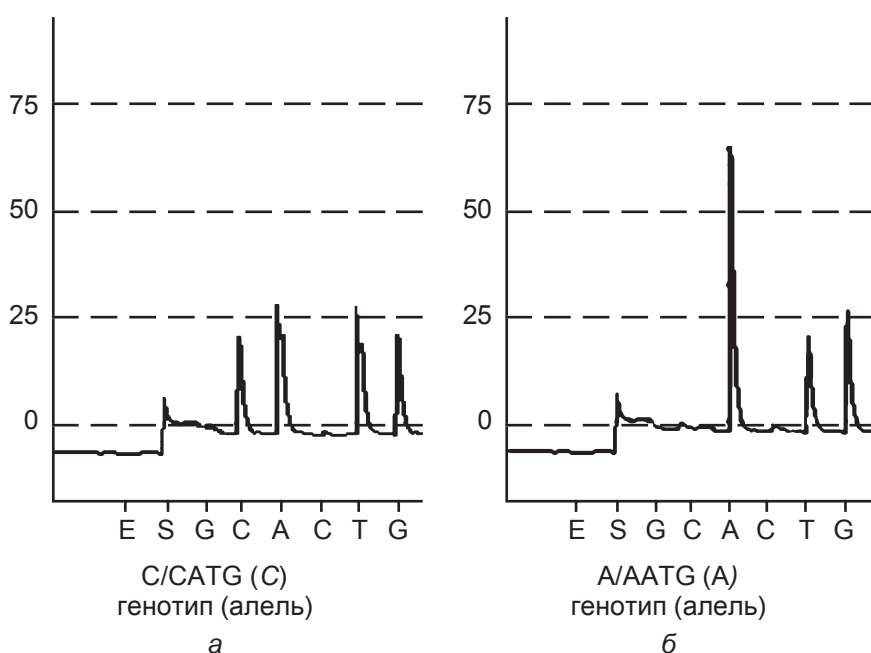


Рис. 4. Генотипування поліморфізму Rs889312 (*MAP3K1*) (а, б)





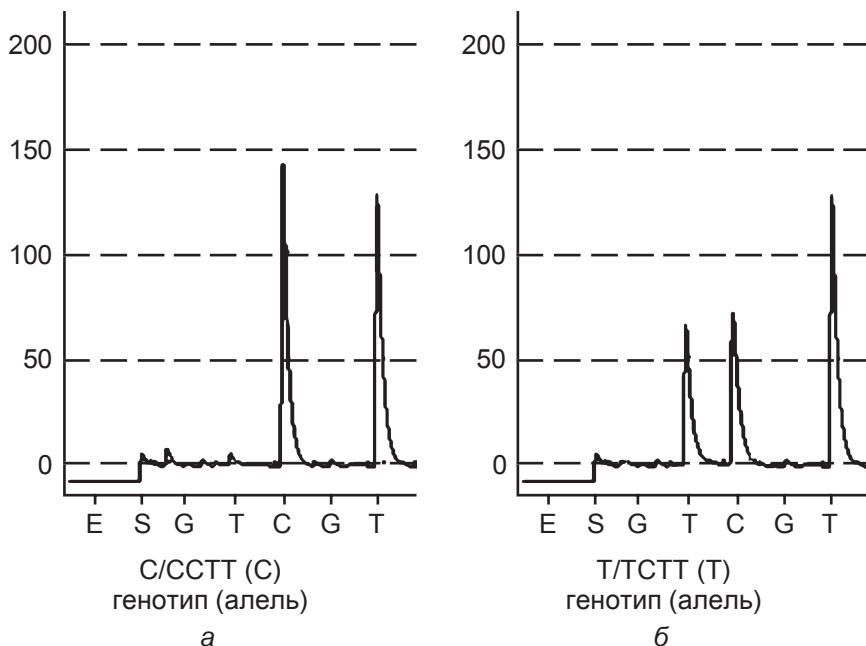


Рис. 5. Генотипування поліморфізму Rs3803662 (*TOX3*) (а, б)

протеїнкіназа є частиною сигнальних каскадів, включаючи ERK, JNK і NFκ сигнальні шляхи. Однонуклеотидні поліморфізми, які несуть ці гени, можуть змінювати їхню функцію і тим самим бути одним із факторів, що сприяє неопластичній трансформації клітин.

### Висновки

1. Вперше запропонований метод аналізу поліморфізмів у генах *TOX3*, *SLC4A7*, *MAP3K1* та *FGFR2* за допомогою технології піросеквенування дозволяє швидко та

вірогідно визначати наявність алельних варіантів поліморфізмів Rs12443621, Rs4973768, Rs2981528 і Rs889312.

2. У результаті дослідження встановлено підвищення частоти зустрічальності поліморфізму TT (Rs4973768) у гені *SLC4A7* у хворих на рак молочної залози. Відношення шансів ризику розвитку раку для цього гена становить 1,89 (ДІ = 1,01–3,971;  $p \leq 0,047$ ; відносний ризик — 1,7;  $p \leq 0,049$ ).

3. Відношення шансів для поліморфізму Rs3803662 становило 1,49, для Rs889312 — 1,59 та для Rs2981582 — 1,29.

Таблиця 2

**Результати піросеквенування поліморфізмів генів *TOX3*, *SLC4A7*, *MAP3K1* та *FGFR2***

SNP	Ген	Мутантний генотип	Відношення шансів	ДІ (95 %)	p	Відносний ризик
Rs3803662	<i>TOX3</i>	TT	1,49	0,7–3,061	$\leq 0,23$	1,4
Rs889312	<i>MAP3K1</i>	CC	1,59	0,749–3,412	$\geq 0,26$	1,5
Rs4973768	<i>SLC4A7</i>	TT	1,89	1,01–3,971	$\leq 0,047$	1,7 $p \leq 0,049$
Rs2981582	<i>FGFR2</i>	TT	1,29	0,93–2,912	$\leq 0,11$	1,2

4. Генотипування поліморфізму Rs12443621 (*TOX3*), Rs4973768 (*SLC4A7*), Rs2981528 (*FGFR2*) та Rs889312 (*MAP3K1*) методом піросеквенування доцільно використовувати при оцінюванні ризику розвитку спорадичного раку молочної залози в комплексі з іншими відомими поліморфізмами у популяційному дослідженні.

### ЛІТЕРАТУРА

1. *The role of genetic cancer susceptibility variants as prognostic factors* / Peter A. Fasching, Paul D. P. Pharoah, Angela Cox [et al.] // *Human Molecular Genetics*. – 2012. – Vol. 21, N 17. – P. 3926–3939.

2. *Breast Cancer Association Consortium. Commonly studied single-nucleotide polymorphisms and breast cancer: results of Breast Cancer Association Consortium* // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2006. – Vol. 98, N 19. – P. 1382–1396.

3. *An Integrative Genomics Approach to Biomarker Discovery in Breast cancer* / Chindo Hicks, Rozana Asfour, Antonio Pannuti [et al.] // *Cancer Informatics*. – 2011. – Vol. 10. – P. 185–204.

4. *Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci* / D. F. Easton, K. A. Pooley, A. M. Dunning [et al.] // *Nature*. – 2007, Jun 28. – Vol. 447 (7148). – P. 1087–1093.

5. *Bubnov V. Hypermethylation of TUSC5 genes in breast cancer tissue* / V. Bubnov, E. Moskalev, Yu. Petrovsky // *Experimental Oncology*. – 2012. – Vol. 34 (4). – P. 370–372.

6. *A genome-wide association study identifies a breast cancer risk variant in ERBB4 at 2q34: results from the Seoul Breast Cancer Study* / Hyung-cheol Kim, Ji-Young Lee, Hyuna Sung [et al.] // *Breast Cancer Research*. – 2012. – Vol. 14. – P. R 56.

7. *The SLC4A7 variant rs4973768 is associated with breast cancer risk: evidence from a case-control study and a meta-analysis* / W. Chen, R. Zhong, J. Ming, L. Zou // *Breast Cancer Res Treat.* – 2012, Dec. – Vol. 136 (3). – P. 847–857.

### REFERENCES

1. Peter A. Fasching, Paul D.P. Pharoah, Angela Cox et al. *The role of genetic cancer susceptibility variants*



as prognostic factors. *Human Molecular genetics* 2012; 21 (17): 3926-3939.

2. Breast Cancer Association Consortium. Commonly studied single-nucleotide polymorphisms and breast cancer: results of Breast Cancer Association Consortium. *J. Natl. Cancer Inst* 2006; 98 (19): 1382-1396.

3. Chindo Hicks, Rozana Asfour, Antonio Pannuti et al. An Integrative Genomics Approach to Biomarker Dis-

covery in Breast cancer. *Cancer Informatics* 2011; 10: 185-204.

4. Easton D.F., Pooley K.A., Dunning A.M., Pharoah P.D., et al. Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature* 2007, Jun 28; 447 (7148): 1087-1093.

5. Bubnov V., Moskalev E., Petrovsky Yu. Hypermethylation of TUSC5 genes in breast cancer tissue. *Experimental Oncology* 2012; 34 (4): 370-372.

6. Hyung-cheol Kim, Ji-Young Lee, Hyuna Sung et al. A genome-wide association study identifies a breast cancer risk variant in *ERBB4* at 2q34: results from the Seoul Breast Cancer Study. *Breast Cancer Research* 2012; 14: R56.

7. Chen W., Zhong R., Ming J., Zou L. The SLC4A7 variant rs4973768 is associated with breast cancer risk: evidence from a case-control study and a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2012, Dec; 136 (3): 847-857.

Надійшла 22.05.2013

Передплачуйте  
і читайте



## ОДЕСЬКИЙ МЕДИЧНИЙ ЖУРНАЛ

Передплата приймається у будь-якому передплатному пункті

Передплатний індекс 48717

У випусках журналу:

- ◆ Теорія і експеримент
- ◆ Клінічна практика
- ◆ Профілактика, реабілітація, валеологія
- ◆ Новітні технології
- ◆ Огляди, рецензії, дискусії

