

INVESTIGAREA UNOR POLIMORFISME GENICE ÎN EXONUL 11 A GENEI BRCA1 LA PACIENTE DIAGNOSTICATE CU CANCER OVARIAN LA VÂRSTĂ TIMPURIE

Andreea CHICOȘ, Aliona MORARIU,
Doina AZOICĂI, Andrei CHICOȘ, Lucian NEGURĂ

Universitatea de Medicina și Farmacie Gr.T Popa Iași

Rezumat

Mutațiile germinale la nivelul genelor BRCA1 și BRCA2 conferă un risc crescut de a dezvolta cancer ovarian, iar unele polimorfisme la nivelul acestor gene pot constitui alele de susceptibilitate cu penetranță scăzută. În această lucrare ne-am propus o evaluare a frecvenței unor polimorfisme genice la nivelul exonului 11 a genei *BRCA1*, într-un lot de 50 de paciente diagnosticate cu cancer ovarian la vârstă timpurie. Frecvența polimorfismul rs19642 în lotul studiat este foarte apropiată de cea identificată la populația Europei, dar diferită de frecvența raportată la populația din Africa sau Asia. În urma secvențierii complete a exonului 11 au fost identificate 7 polimorfisme mononucleotidice comune (SNP) ale genei *BRCA1*: rs1799949, rs16940, rs799917, rs16941, rs16942 rs4986850 și rs1799950 care au fost asociate unui număr de 4 haplotipuri. Cele mai frecvente haplotipuri (H1 și H2) cumulează peste 80% dintre alelele acestui lot de paciente și păstrează proporțiile descrise în literatura de specialitate.

Cuvinte-cheie: cancer ovarian, investigare, exon 11

Summary. Investigation of exon 11 BRCA1 gene polymorphisms in patients diagnosed with ovarian cancer at early age

Germline BRCA1 or BRCA2 mutations increase ovarian cancer risk and some polymorphisms in these genes could represent low penetrance susceptibility alleles. The aim of the study was to evaluate the frequency of several polymorphisms at exon 11 of BRCA 1 gene in a cohort of 50 patients diagnosed with ovarian cancer in early age. The frequency of rs19642 polymorphism was close to the value found in the population of Europe, but different from the frequency reported in Africa or Asia. After complete sequencing of exon 11 a number of 7 common SNPs of the BRCA1 gene were identified: rs1799949, rs16940, rs799917, rs16941, rs16942 rs4986850 and rs1799950 which were associated to 4 haplotypes. The most common haplotypes (H1 and H2) accumulate over 80% of the alleles in this group of patients and keep the ratio described in the literature. The results presented here are from a small population of women with ovarian tumours but further validation of this conclusion can be obtained by conducting a study with larger population of patients.

Key-words: ovarian cancer, investigation, exon 11

Резюме. Исследование полиморфизмов экзона 11 в гене BRCA1 у пациентов с диагнозом рака яичников в раннем возрасте

Мутации зародышевой линии в генах BRCA1 и BRCA2 увеличивают риск развития рака яичников, и некоторые полиморфизмы в этих генах могут быть аллелями восприимчивости с низкой пенетрантностью. В этой работе мы предложили оценить частоту некоторых генных полиморфизмов в 11 экзоне гена BRCA1 в группе из 50 пациенток с диагнозом рака яичников в раннем возрасте. Частота полиморфизма rs19642 в исследуемой группе очень близко к то, что выявлено в популяции Европы, но отличается от частоты зарегистрированной в популяции Африки или Азии. После полного секвенирования экзона 11 было идентифицировано 7 общих мононуклеотидных полиморфизмов (SNP) гена BRCA1: rs1799949, rs16940, rs799917, rs16941, rs16942 rs4986850 и rs1799950, которые были связаны с 4 гаплотипа. Наиболее распространенные гаплотипы (H1 и H2) представляют более 80% аллелей этой группы пациентов и соблюдают пропорции, описанные в литературе.

Ключевые слова: рак яичников, исследование, экзон 11

Introducere

Cancerul ovarian este a 8-a cea mai fatală boală neoplazică în rândul femeilor înregistrând peste 180.000 de decese la nivel mondial (Ferlay et al., 2018), cele mai multe fiind înregistrate pe continentul European (GLOBOCAN 2018, <http://gco.iarc.fr/>, cu precădere în țările fostului bloc comunist. Astfel, țări precum Polonia, Letonia, Lituania, Ungaria sau România raportează o rată a mortalității standardizată

cu vârsta populației europene peste valoarea medie de 7,1/100000 de locuitori, înregistrată în Uniunea Europeană (ECIS 2018, <https://ecis.jrc.ec.europa.eu>).

Diagnosticarea precoce a acestei maladii reprezintă cheia pentru scăderea mortalității în cancerul ovarian. Acest deziderat poate fi realizat prin identificarea femeilor care au un risc crescut de a dezvolta o patologie malignă a ovarelor (Romanowicz et al., 2017).

Tabelul I.

Codificarea polimorfismelor studiate după modelul utilizat în Laboratorul de Epidemiologie Moleculară, UMF Iași (restul datelor din tabel sunt preluate de pe site-ul U.S. National Library of Medicine, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

cod	Exon	codon	HGVS gdot	HGVS cdot	HGVS pdot	NCBI dbSNP	BIC cod	Frecvența (dbSNP)
a	11-4	694	g.124535C>T	c.2082C>T	Ser694Ser	rs1799949	2201C>T	0.34
b	11-4	693	g.124530G>A	c.2077G>A	Asp693Asn	rs4986850	2196G>A	0.03
c	11-5	771	g.124764T>C	c.2311T>C	Leu771Leu	rs16940	2430T>C	0.33
d	11-6	871	g.125065C>T	c.2612C>T	Pro871Leu	rs799917	2731C>T	0.46
g	11-7	1038	g.125566A>G	c.3113A>G	Glu1038Gly	rs16941	3232A>G	0.34
f	11-7	1040	g.125572G>A	c.3119G>A	Ser1040Asn	rs4986852	3238G>A	0.01
h	11-8	1183	g.126001A>G	c.3548A>G	Lys1183Arg	rs16942	3667A>G	0.35
l	11-2	356	g.123520A>G	c.1067A>G	Gln356Arg	rs1799950	1186A>G	0.02

În prezent, riscul cel mai ridicat de boală neoplazică a ovarelor îl au femeile purtătoare de mutații în genele *BRCA1* (riscul calculat pe durata întregii vieți între 16% și 68%), și *BRCA2* (între 11% și 27%). Această variabilitate a riscului a fost pusă pe seama factorilor genetici cu penetranță scăzută, care modifică riscul conferit de mutațiile genetice (Milne, Antoniou, 2016). Studii recente identifică numeroase polimorfisme mononucleotidice (single nucleotide polymorphism – SNP), care sunt asociate cancerului ovarian (Giannakeas et al., 2015,), cele mai multe dintre acesta fiind identificate la nivelul genei *BRCA1* (Konecny et al., 2011)

În această lucrare ne-am propus o evaluare a factorilor genetici cu penetranță populațională scăzută (polimorfisme genice) a exonului 11 a genei *BRCA1*, la paciente diagnosticate cu cancer ovarian la vârstă timpurie, prin tehnici de biologie moleculară, în contextul datelor existente până la acest moment în literatura de specialitate.

Pacienți și metode cercetare

Pentru acest studiu s-a selectat din baza de date a Departamentului de Oncogenetică UMF Iași un lot de 50 de paciente diagnosticate cu neoplasm ovarian înainte de a împlini vârsta de 60 de ani. Extracția ADN, s-a realizat cu kit-uri de extracție *Wizard® Genomic DNA Purification Kit Promega™* și protocolul de extracție pentru 6 ml de sânge periferic, optimizat în laboratorul Departamentului de Oncogenetică al UMF Iași. Toți pacienții au exprimat acordul de a participa la acest studiu prin semnarea unui consimțământ informat în cercetare, validat și aprobat în Departamentului de Oncogenetică și de către Comisia de Etică a UMF Iași.

A fost secvențiat complet, prin metoda Sanger, exonul 11 al genei *BRCA1* la 12 din cele 50 de paciente selectate aleator. Datele obținute în urma sec-

vențierii, au fost interpretate utilizând softul Seqman (DNA Star). De asemenea, s-a determinat frecvența SNP rs16942 la toate cele 50 de paciente incluse în studiu, secvențiindu-se la toate pacientele regiunea 3'-terminală a exonului 11.

Analiza statistică a datelor pacienților a fost realizată utilizând SPSS 20.0. S-a realizat doar o prelucrare primară a datelor, utilizând metode descriptive de calcul statistic și testul χ^2 - test neparametric calitativ, care compară distribuții de frecvență.

Rezultate

Pacientele incluse în studiu au avut vârsta cuprinsă în intervalul 18-67 de ani, cu o medie de $47,2 \pm 8,73$ ani. Vârsta medie la diagnostic, în cadrul lotului de studiu, a fost de $45,38 \pm 8,79$ ani. După amplificarea PCR a regiunii exonice 11-8 a celor 50 de paciente incluse în studiu, au fost identificate 30 de paciente heterozigote cu SNP rs16942, 3 paciente homozigote și 17 paciente wild-type. Calcularea frecvenței alelice indică o valoare de 0,36. În urma amplificării și secvențierii celor 9 regiuni diferite a exonului 11, la 12 paciente selectate aleator, au fost identificate 7 SNP-uri, codificate după modelul prezentat în *tabelul I*. Cel mai frecvent au fost identificate polimorfismele a, c, d, g și h (rs1799949, rs16940, rs799917, rs16941, rs16942). Acestea au fost depistate la 9 (75%) dintre cele 12 paciente atât în stare heterozigotă cât și în stare homozigotă (*figura 1*). Polimorfismul b (rs4986850) a fost identificat la doar 2 paciente (16,6%) ambele în stare heterozigotă, în timp ce polimorfismul l (rs1799950) a fost identificat în stare heterozigotă la o singură pacientă (8,3%). Polimorfismul corespunzător literei f (rs4986853) nu a fost identificat la nici una dintre pacientele analizate. În cazul a 2 paciente (OVR 56, OVR 61) nu au fost identificate variații genice în exonul 11 al genei *BRCA1*.

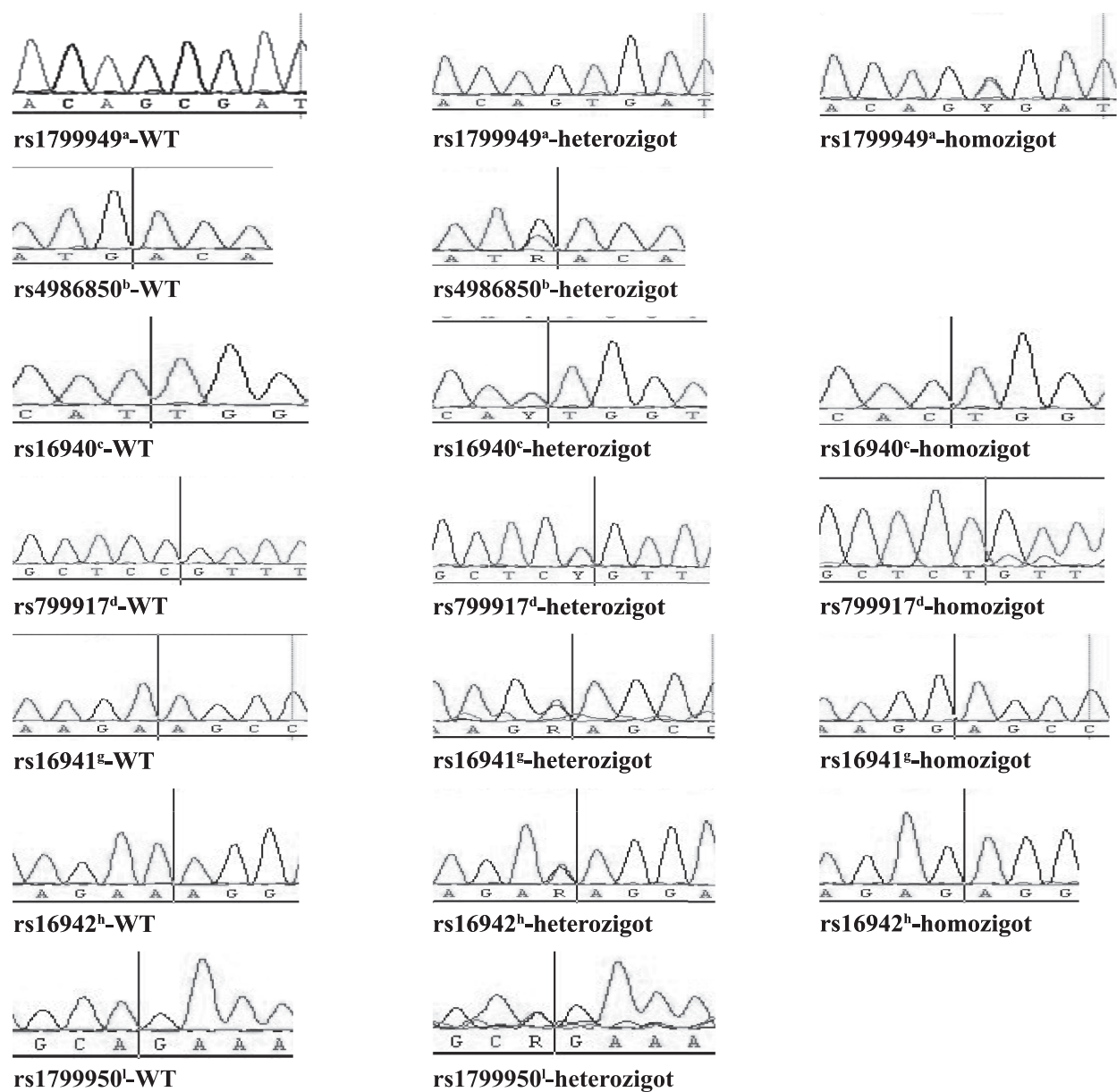


Figura 1. Secvența diferitor regiuni ale exonului 11 a genei BRCA1 la paciențele analizate. Cele 7 polimorfisme detectate sunt prezentate în stare WT, heterozogota și homozigota.

Asocierea în haplotipuri s-a realizat după modelul publicat de Judkins et al. în 2005. În *tabelul III* și *IV*, sunt prezentate frecvența acestor haplotipuri, precum și asocierea SNP-urilor identificate în acest studiu, cu haplotipurile *BRCA1*.

Discuții

Argumentul principal pentru care am ales SNP rs16942, este dat de frecvența cu care el este raportat

în literatura de specialitate. Astfel, conform datelor publicate pe site-ul U.S. National Library of Medicine, acest polimorfism este pe locul 2 (0,355), după rs799917, ca frecvență în populația europeană (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs16942#seq_hash). Dat fiind faptul că rs799917 a fost extensiv studiat, am considerat că evaluarea prevalenței acestui polimorfism în lotul studiat, poate aduce informații științifice mai relevante. Din datele noastre acesta este

Frecvența haplotipurilor identificate în studiul nostru					
Haplotip	H1	H2	H3	H6	Total
Nr.	10	11	2	1	24
Frecvența raportată la 24 de alele	0,416	0,458	0,083	0,041	1.000

Tabelul III.

Tabelul IV.

Distribuția polimorfismelor la nivelul exonului 11 la cele 12 paciente selectate și asocierea acestora cu haplotipurile *BRCA*

Pacient	SNP								Haplotip
	a	b	c	d	f	g	h	l	
OVR52	-	-	-	-	-	-	-	-	H1H1
OVR57	-	-	-	-	-	-	-	l	H6H1
OVR60	a	-	c	d	-	g	h	-	H1H2
OVR61	-	-	-	-	-	-	-	-	H1H1
OVR65	a	-	c	d	-	g	h	-	H1H2
OVR76	aa	b	cc	dd	-	gg	hh	-	H2H3
OVR77	a	-	c	d	-	g	h	-	H1H2
OVR78	aa	-	cc	dd	-	gg	hh	-	H2H2
OVR80	a	-	c	d	-	g	h	-	H1H2
OVR83	aa	-	cc	dd	-	gg	hh	-	H2H2
OVR91	aa	b	cc	dd	-	gg	hh	-	H2H3
OVR101	a	-	c	d	-	g	h	-	H1H2

primul studiu care raportează frecvența polimorfismului rs16942 în România. Datele obținute de noi – frecvența allelică 0,36, sunt similare mediei europene

În urma secvențierii complete a exonului 11 *BRCA1*, au fost identificate 7 polimorfisme care se regăsesc în lista celor 12, respectiv 14 polimorfisme identificate de Shattuck-Eidens și Judkins ca fiind comune și astfel, asociate unor haplotipuri. Respectând sistemul descris Judkins et al., am grupat aceste polimorfisme în 4 haplotipuri (H1, H2, H3, H6). Dintre cele 10 haplotipuri raportate de Judkins et al., 6 nu se regăsesc în studiul nostru, probabil din cauza numărului mic de paciente la care s-a realizat secvențierea. Prin urmare, considerăm că sunt necesare studii ulterioare, pe loturi mai ample.

Cele mai frecvente haplotipuri - H1 și H2, fiecare având o frecvență de peste 0,4 sunt raportate și în literatură ca fiind preponderente, acestea înglobând aproximativ 80% din alelele identificate în populația europeană sau nord-americană (Judkins et al., 2015). Totuși, în studiul nostru, cel mai frecvent haplotip a fost H2 (0,458) spre deosebire de (Judkins et al., 2005) care plasează H1 pe primul loc urmat de H2.

Deși frecvența cumulată a celor două haplotipuri este similară, există diferențe privind ponderea acestor haplotipuri. Astfel, Judkins et al. (Judkins et al., 2005) raportează o frecvență mai mică a haplotipului H2 (0,230) și mai mare, a haplotipului H1 (0,550).

O frecvență a H2 de 0,60 apropiată de cea identificată de noi, a fost raportată în India într-un lot de 50 de paciente diagnosticate cu neoplazie mamară la

vârstă timpurie, acest haplotip fiind asociat cu un risc crescut de cancer mamar (OR: 2.33 95%CI: 1.31–4.17) (Juwle A, Saranath D, 2012). Un risc crescut de neoplazie a sânelui (OR: 1,18, 05%CI: 1.02-1.37), pentru purtătorii acestui haplotip, este identificat și într-un alt studiu de tip caz-martor (1323 de cazuri și 1910 martori) (Cox et al., 2005).

Nu am găsit date cu privire la asocierea celorlalte 5 polimorfisme identificate în lotul nostru de pacienți, cu riscul de apariție a cancerului ovarian. Toate datele din literatură se referă la paciente cu sindrom de cancer ereditar de ovar și sân (HBOC), prin urmare, cuantificarea acestor SNP la paciente cu cancer ovarian sunt o noutate și compararea datelor noastre cu cele din literatură poate fi cel mult orientativă. Polimorfismul codificat cu litera d (rs799917), prezintă controverse privind riscul de neoplasm mamar. Unii autori (Nicoloso et al., 2010) arată un risc de aproximativ 2 ori mai mare de neoplazie mamară (OR: 1.95, 95%CI: 1.06-3.6) la purtătorii SNP rs799917 în gena *BRCA1*, iar alții (Borg et al., 2010, Dombernowsky et al., 2009; Yang et al., 2019).) nu confirmă aceste constatări.

Aceeași situație se constată și în datele privind polimorfismele rs1799950 sau rs16941: risc diminuat de cancer mamar (Borg et al., 2010), risc crescut (Cox et al., 2005, Dombernowsky et al., 2009).

Privind în ansamblu, aceste date pot fi interpretate, la acest moment, ca preliminară, în principal datorită lotului restrâns de studiu. Totuși, rezultatele obținute deschid perspectivele efectuării unor analize

genetice mai ample, care să permită evaluarea prevalenței polimorfismelor mononucleotidice la pacienții diagnosticați cu cancer ovarian din România și implicațiile acestora în determinarea riscului de apariție a acestei maladii.

Concluzii

În urma investigațiilor efectuate de către noi, au fost identificate 7 polimorfisme mononucleotidice comune (SNP) ale genei *BRCA1*, asociate unui număr de 4 haplotipuri. Frecvența cu care a fost identificat polimorfismul rs19642 în lotul studiat este foarte apropiată de cea identificată la populația Europei. Frecvența haplotipurilor majore *BRCA1* (H1 și H2) păstrează proporțiile descrise în literatura de specialitate, cu particularitatea că frecvența H1 este mai scăzută în studiul nostru decât frecvența raportată în literatură, iar cea a haplotipului H2 este mai crescută. Rezultatele prezentate au fost obținute pe un lot insuficient de mare de pacienți astfel încât pentru validarea acestor concluzii sunt necesare studii în populații mai ample.

Cercetările pentru această lucrare au fost finanțate din proiectele ERASMUS + HOPE 2018-1-RO01-KA202-049189 și contract de finanțare pentru execuție granturi interne UMF Gr. T Popa Iași nr. 27502.

Bibliografie

1. Borg A., Haile R.W., Malone K.E. et al. *Characterization of BRCA1 and BRCA2 deleterious mutations and variants of unknown clinical significance in unilateral and bilateral breast cancer: the WECARE study*. Hum Mutat 2010; 31(3): E1200-1240.
2. Cox D.G., Kraft P., Hankinson S.E., Hunter D.J. *Haplotype analysis of common variants in the BRCA1 gene and risk of sporadic breast cancer*. Breast Cancer Res 2005; 7(2): R.171-175.
3. Dombernowsky S.L., Weischer M., Freiberg J.J. et al. *Missense polymorphisms in BRCA1 and BRCA2 and risk of breast and ovarian cancer*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2009; 18(8): 2339-2342.
4. ECIS 2018, <https://ecis.jrc.ec.europa.eu>
5. Ferlay J., Colombet M., Soerjomataram I., et al. *Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods*. Int J Cancer 2019; 144(8): 1941-1953.
6. Giannakeas V., Sopik V., Shestopaloff K., et al. *A model for estimating ovarian cancer risk: application for preventive oophorectomy*. Gynecol Oncol 2015; 139(2): 242-247.
7. GLOBOCAN 2018, <http://gco.iarc.fr/>
8. Judkins T., Hendrickson B.C., Deffenbaugh A.M., Scholl T. *Single nucleotide polymorphisms in clinical genetic testing: the characterization of the clinical significance of genetic variants and their application in clinical research for BRCA1*. Mutat Res 2005; 573(1-2): 168-179.
9. Juwle A., Saranath D. *BRCA1/BRCA2 gene mutations/SNPs and BRCA1 haplotypes in early-onset breast cancer patients of Indian ethnicity*. Med. Oncol. 2012; 29(5): 3272-3281.
10. Konecny M., Milly M., Zavodna K. et al. *Comprehensive genetic characterization of hereditary breast/ovarian cancer families from Slovakia*. Breast Cancer Res. Treat 2011; 126(1): 119-130.
11. Milne R.L., Antoniou A.C. *Modifiers of breast and ovarian cancer risks for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers*. Endocr Relat Cancer 2016; 23(10): 69-84.
12. Nicoloso M.S., Sun H., Spizzo R. et al. *Single-nucleotide polymorphisms inside microRNA target sites influence tumor susceptibility*. Cancer Res 2010; 70(7): 2789-2798.
13. Romanowicz H., Michalska M.M., Samulak D., et al. *Association of R156R single nucleotide polymorphism of the ERCC2 gene with the susceptibility to ovarian cancer*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2017; 208: 36-40.
14. Yang M., Du X., Zhang F., Yuan S. *Association between BRCA1 polymorphisms rs799917 and rs1799966 and breast cancer risk: a meta-analysis*. J Int. Med. Res. 2019; 47(4): 1409-1416.