

УДК 618.11-006.6:575.113

**ПОИСК АССОЦИАЦИЙ ВАРИАНТОВ C.1492 G>A/MRE11 И
C.1480G>A/MRE11 С РИСКОМ РАЗВИТИЯ РАКА ЯИЧНИКОВ
У ЖЕНЩИН ИЗ РЕСПУБЛИКИ БАШКОРТОСТАН**

Богданова Н.В.¹, Валова Я.В.^{2,3}, Прокофьева Д.С.³, Мингажева Э.Т.³, Хуснутдинова Э.К.^{3,4}

¹Высшая медицинская школа Ганновера, Ганновер, Германия

²ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», Уфа, Россия

³ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет», Уфа, Россия

⁴ОСП ФГБНУ УФИЦ РАН «Институт биохимии и генетики», Уфа, Россия

Цель работы заключалась в проведении ассоциативного анализа герминальных вариантов с.1480G>A с.1492G>A в гене MRE11 с риском развития рака яичников (РЯ) у женщин, проживающих в Республике Башкортостан. Поиск изменений проводили методом полимеразной цепной реакции синтеза с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. В результате скрининга нам не удалось обнаружить носительниц исследуемых вариантов среди больных РЯ и здоровых женщин контрольной группы. Полученные результаты свидетельствуют о низкой частоте встречаемости вариантов с.1480G>A и с.1492G>A в гене MRE11 у женщин из Республики Башкортостан.

Ключевые слова: рак яичников, ассоциативный анализ, MRE11, rs104895016, rs564511708.

Для цитирования: Богданова Н.В., Валова Я.В., Прокофьева Д.С., Мингажева Э.Т., Хуснутдинова Э.К. Поиск ассоциаций вариантов C.1492 G>A/MRE11 и C.1480G>A/MRE11 с риском развития рака яичников у женщин из Республики Башкортостан. Медицина труда и экология человека. 2021;2:93-100.

Для корреспонденции: Валова Яна Валерьевна, м.н.с. отдела токсикологии и генетики, Q.juk@yandex.ru.

Финансирование: исследование поддержано программой развития биоресурсных коллекций ФАНО. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-29-09129; государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (FZWU2020-0027). Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-34-90003.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

DOI: <http://dx.doi.org/10.24411/2411-3794-2021-10208>

**SEARCH FOR ASSOCIATIONS OF VARIANTS C.1492 G> A / MRE11 AND
C.1480G> A / MRE11 WITH THE RISK OF DEVELOPING OVARIAN CANCER IN
WOMEN FROM THE REPUBLIC OF BASHKORTOSTAN**

Bogdanova N.V.¹, Valova Y.V.^{2,3}, Prokofyeva D.S.³, Mingazheva E.T.³, Khusnutdinova E.K.^{3,4}

1- Hannover Medical School, Hannover, Germany

2- Ufa Research Institute of Occupational Health and Human Ecology, Ufa,
Russia

3- Bashkir State University, Ufa, Russia

4- Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

The aim of the work was to conduct an associative analysis of germinal variants c.1480G> A c.1492G> A in the MRE11 gene with the risk of developing OC in women living in the Republic of Bashkortostan. The search for changes was carried out by the method of polymerase chain reaction of DNA synthesis with subsequent analysis of the restriction fragment length polymorphism. As a result of screening, we were unable to find carriers of the studied variants among patients with OC and healthy women in the control group. The results obtained indicate a low frequency of occurrence of the variants c.1480G> A and c.1492G> A in the MRE11 gene in women from the Republic of Bashkortostan.

Key words: ovarian cancer, associative analysis, MRE11, rs104895016, rs564511708

Citation: Bogdanova N.V., Valova Y.V., Prokofyeva D.S., Mingazheva E.T., Khusnutdinova E.K. Search for associations of variants c.1492 g> a / mre11 and c.1480g> a / mre11 with the risk of developing ovarian cancer in women from the republic of bashkortostan. Occupational health and human ecology. 2021: 2:93-100.

Correspondence: Valova Yana, junior researcher Department of Toxicology and Genetics, Q.juk@yandex.ru.

Financing: The study was supported by the FANO Bioresource Collections Development Program. This work was carried out with the financial support of the RFBR grant No. 18-29-09129; state assignment of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (FZWU2020-0027). The reported study was funded by RFBR according to the research project № 20-34-90003

Conflict of interest: the authors declare no conflicts of interest.

DOI: <http://dx.doi.org/10.24411/2411-3794-2021-10208>

В структуре онкологических заболеваний женского населения во всем мире рак яичников (РЯ) является седьмой по распространенности формой онкопатологии. Ежегодно в мире регистрируется более 313 000 новых случаев заболевания, при этом более половины из них заканчиваются летальным исходом [1]. В России РЯ занимает десятое место в структуре онкологических заболеваний и восьмое место среди причин онкологической смертности среди женского населения. В 2018 году в нашей стране было зарегистрировано 14 206 новых случаев и 7 520 смертей по причине данного заболевания [2].

Отсутствие эффективных методов ранней диагностики (80% случаев диагностируются после обширных метастазов на III или IV стадии), неблагоприятный прогноз на поздних стадиях опухолевого процесса (пятилетняя выживаемость на III и IV стадиях составляет 41 и 20% соответственно), высокие показатели смертности делают данное заболевание одной из наиболее сложных форм онкопатологии [3].

В основе патогенеза РЯ, как и других злокачественных новообразований, лежат многочисленные повреждения генетического аппарата клеток. Дефекты определенных участков ДНК приводят к нарушению механизмов контроля за клеточной пролиферацией и дифференцировкой и, в конце концов, к формированию опухоли. При этом мутации, возникающие в половых клетках, могут передаваться в ряду поколений, обуславливая

наследственную предрасположенность к возникновению злокачественной опухоли [4]. Доля наследственно-обусловленного РЯ колеблется от 10 до 19% всех случаев злокачественных эпителиальных новообразований яичников [5]. Высокий риск данной патологии в первую очередь связан с герминальными мутациями в генах-супрессорах опухолевого роста *BRCA1* и *BRCA2*, белковые продукты которых осуществляют контроль целостности генома [6]. Патогенные мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2* обнаруживаются в 10–15% спорадических форм РЯ и составляют до 40% наследственных случаев РЯ [7,8]. Однако на сегодняшний день известно по меньшей мере 16 генов с умеренной и низкой пенетрантностью, вовлеченных в патогенез наследственного и спорадического РЯ [9].

Ген *MRE11* кодирует белок, являющийся частью комплекса MRN (*MRE11*, *RAD50* и *NBS1*), который представляет собой важный компонент в процессе репарации ДНК. Комплекс MRN служит своеобразным датчиком разрыва ДНК, обнаруживая повреждение и запуская каскад сигнальных реакций, необходимых для остановки клеточного цикла и восстановления структуры молекулы по комплементарной цепи [10].

Нарушение работы MRN-комплекса приводит к геномной нестабильности и ассоциирован с развитием злокачественных новообразований различной этиологии, включая рак молочной железы, РЯ, рак мозга, желудка, простаты, печени, легких [11-17].

Целью данного исследования был поиск ассоциаций вариантов с.1492 G>A/ *MRE11* и с.1480G>A/*MRE11* с риском развития РЯ у женщин, проживающих в Республике Башкортостан.

Материалы и методы.

Материалом для исследования послужили образцы ДНК женщин с установленным диагнозом РЯ (n=213) и женщин без онкологических заболеваний на момент забора крови (n=288) в возрасте 17-87 лет из Республики Башкортостан. Забор периферической венозной крови проводился сотрудниками Республиканского клинического онкологического диспансера МЗ РБ (г. Уфа) и онкологического отделения Городской клинической больницы №1 (г. Стерлитамак). Геномную ДНК выделяли из лейкоцитов периферической венозной крови стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции. Детекцию патогенных вариантов проводили методами полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ). Перечень исследованных локусов, последовательности праймеров, размеры амплифицируемых фрагментов, название эндонуклеазы рестрикции представлены в таблице 1.

Таблица 1

Последовательности праймеров и эндонуклеазы рестрикции, используемые в исследовании

Локус, ген	Последовательности праймеров, 5'-3'	† Отжига, °С	Рестриктаза, последовательность 5'-3', оптимальная †	Аллели, размер фрагментов (п.н.)
с.1492G>A (MRE11)	ССААССАТАТГСААГАСТСТГТТС	58	TaqIT [^] CGA..., 65	Аллель G 206+14+138
	ТГСТААСАГАААГАГГГАТГГГ			Аллель А 218+138
с.1480G>A (MRE11)	ССААССАТАТГСААГАСТСТГТТС	58	TaqIT [^] CGA....., 65	Аллель G 206+14+138 Аллель А 206+150

Разделение фрагментов ДНК после амплификации и рестрикции проводили в 7% полиакриламидном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием и визуализацией в проходящем УФ-свете.

Результаты. Варианты с.1492 G>A/MRE11 и с.1480G>A/MRE11 были выявлены нами в результате ранее проведенного таргетного NGS-секвенирования 21 гена-кандидата РЯ в герминальных образцах ДНК пациенток из Башкортостана с наследственными формами РЯ (n=48) и последующей биоинформатической обработки данных. Все выявленные изменения были верифицированы методом секвенирования по Сэнгеру (рис. 1).

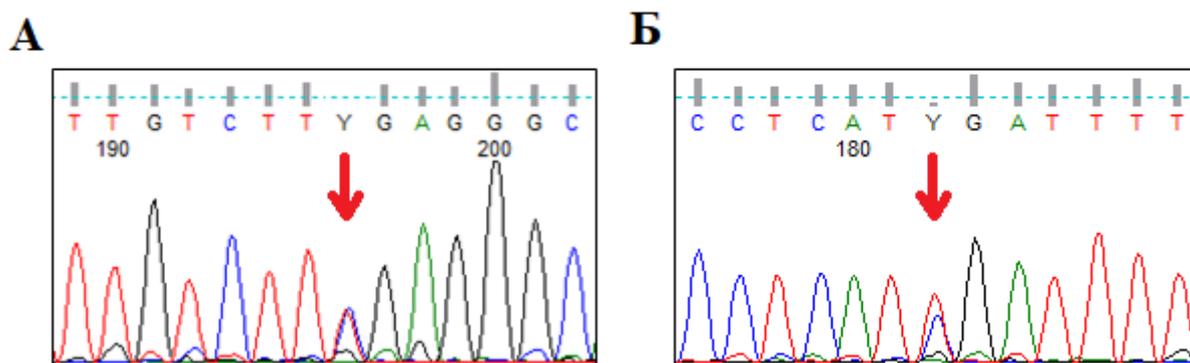


Рис.1. Фрагменты нуклеотидной последовательности гена MRE11 с вариантами А - с.1480 G>A , Б - с.1492G>A

Для оценки роли выявленных вариантов в патогенезе РЯ был проведен поиск данных изменений в общей выборке больных РЯ и здоровых индивидов из Республики Башкортостан.

В результате проведенного скрининга нами не было выявлено дополнительных носительниц вариантов с.1492G>A/*MRE11* и с.1480G>A/*MRE11* ни в группе больных РЯ, ни в группе контроля (рис. 2), что свидетельствует о низкой частоте встречаемости вариантов с.1480G>A и с.1492G>A в гене *MRE11* у женщин из Республики Башкортостан.

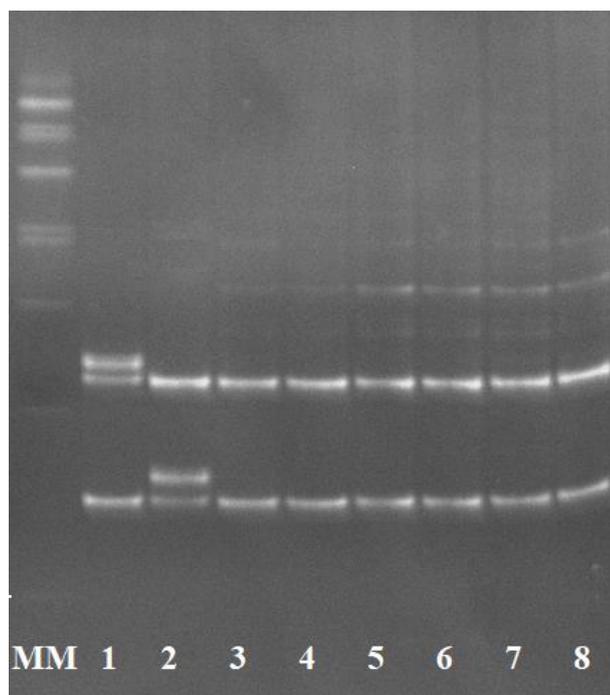


Рис. 2. Образец 1 - носительница варианта с.1492G>A/*MRE11*, образец 2 - носительница варианта с.1480G>A/*MRE11*, образцы 3-8 - дикий тип

Обсуждение. Вариант с.1480G>A/*MRE11A* приводит к замене глутаминовой кислоты на лизин в 494 положении. По результатам анализа данного варианта с помощью алгоритмов, предсказывающих влияние аминокислотной замены на структуру и функцию белка (SIFT, PolyPhen-2, Align-GVGD), три из пяти идентифицировали данный вариант как непатогенный. Однако экспериментальные доказательства, демонстрирующие влияние на функцию белка, по-видимому, отсутствуют.

В нескольких исследованиях сообщалось, что вариант с.1480G>A был обнаружен у лиц, страдающих РМЖ. В работе Saminsky этот вариант наблюдался у 1 из 287 пациенток с наследственным РМЖ. В семейном анамнезе женщины был зарегистрирован случай РЯ [12]. В другом исследовании это изменение было выявлено у 2 из 1824 пациентов с тройным негативным РМЖ без семейного анамнеза РМЖ и/или РЯ [13].

Тем не менее имеющиеся на сегодняшний день данные не позволяют сделать однозначных выводов относительно роли варианта с.1480G>A/*MRE11A* в патогенезе наследственного РМЖ и/или РЯ.

Вариант с.1492G>A приводит к замене аспарагиновой кислоты на аспарагин в 498 положении. Эксперименты *in silico* показали, что данное изменение, вероятнее всего, не нарушает структуру и функцию белка, однако на сегодняшний день нет опубликованных функциональных исследований, подтверждающих данный прогноз.

Выводы. Ввиду низкой встречаемости редких аллелей вариантов с.1480G>A /*MRE11A* и с.1492G>A /*MRE11A* среди женщин из Республики Башкортостан нам не удалось провести ассоциативный анализ данных изменений с развитием РЯ. Для оценки вклада исследуемых вариантов в патогенезе заболевания необходимо проведение дальнейших исследований на расширенной выборке.

Список литературы:

1. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A *CA Cancer J Clin.* 2018 Nov; 68(6):394-424.
2. Состояние онкологической помощи населению России в 2019 году. Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой М.: МНИОИ им. П.А. Герцена. 2020; 239.
3. Ovarian cancer statistics, 2018. Torre LA, Trabert B, DeSantis CE, Miller KD, Samimi G, Runowicz CD, Gaudet MM, Jemal A, Siegel RL *CA Cancer J Clin.* 2018 Jul; 68(4):284-296.
4. Чернобай А. В. Рак яичника: патогенез, диагностика, современные аспекты лечения. *Вісник проблем біології і медицини.* 2013;1(2).
5. Long K. C., Kauff N. D. Hereditary ovarian cancer: recent molecular insights and their impact on screening strategies. *Curr Opin Oncol.* 2011 Sep;23 (5):526-30.
6. Любченко Л. Н., Батенева Е. И, Абрамов И. С., Емельянова М. А., Будик Ю. А., Тюляндина А. С., и др. Наследственный рак молочной железы и яичников. Злокачественные опухоли. 2013; 2 (6).
7. S. Zhang, R. Royer, S. Li, J.R. McLaughlin, B. Rosen, H.A. Risch, et al. Frequencies of BRCA1 and BRCA2 mutations among 1,342 unselected patients with invasive ovarian cancer *Gynecol. Oncol.* 2011;121(2) : 353-357
8. Ramus, P.A. Harrington, C. Pye, R.A. DiCioccio, M.J. Cox, K. Garlinghouse-Jones, et al. Contribution of BRCA1 and BRCA2 mutations to inherited ovarian cancer *Hum. Mutat.* 2007; 28 (12) :1207-1215.
9. Toss A., Tomasello C., Razzaboni E., Contu G., Grandi G., Cagnacci A. et al. Hereditary ovarian cancer: not only BRCA 1 and 2 genes. *BioMed research international.* 2015.
10. Paull, Tanya T., and Rajashree A. Deshpande. "The Mre11/Rad50/Nbs1 complex: recent insights into catalytic activities and ATP-driven conformational changes." *Experimental cell research.* 2014; 329(1): 139.
11. Brandt, S., Samartzis, E. P., Zimmermann, A. K., Fink, D., Moch, H., Noske, A. et al. "Lack of MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) complex detection occurs frequently in low-grade epithelial ovarian cancer." *BMC cancer* 2017; 17(1) : 1-9.
12. Hsu, H. M., Wang, H. C., Chen, S. T., Hsu, G. C., Shen, C. Y., & Yu, J. C. "Breast cancer risk is associated with the genes encoding the DNA double-strand break repair Mre11/Rad50/Nbs1 complex." *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers.* 2007;16 (10): 2024-2032.

13. Kim, H. S., Kim, J. W., Hwang, I. G., Lee, H. S., Kim, W. H. "Expression of DNA Damage Response Markers in Early-Onset or Familial Gastric Cancers." *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*. 2019; 20(5): 1369.
14. Zhen, J. T., Syed, J., Nguyen, K. A., Leapman, M. S., Agarwal, N., Brierley, K. et al. "Genetic testing for hereditary prostate cancer: Current status and limitations." *Cancer*. 2018;124(15): 3105-3117.
15. Kałużna, E. M., Rembowska, J., Ziółkowska-Suchanek, I., Świątek-Kościelna, B., Gabryel, P., Dyszkiewicz, W., Nowak, J. S. "Heterozygous p. I171V mutation of the NBN gene as a risk factor for lung cancer development." *Oncology letters*. 2015;10 (5): 3300-3304.
16. Simonetti, G., Padella, A., do Valle, I. F., Fontana, M. C., Fonzi, E., Bruno, S. et al. "Aneuploid acute myeloid leukemia exhibits a signature of genomic alterations in the cell cycle and protein degradation machinery." *Cancer*. 2019; 125(5): 712-725.
17. Caminsky, N. G., Mucaki, E. J., Perri, A. M., Lu, R., Knoll, J. H., & Rogan, P. K. et al. "Prioritizing variants in complete hereditary breast and ovarian cancer genes in patients lacking known BRCA mutations." *Human mutation*. 2016; 37(7): 640-652.
18. Koczkowska, M., Krawczynska, N., Stukan, M., Kuzniacka, A., Brozek, I., Sniadecki, M. et al. "Spectrum and prevalence of pathogenic variants in ovarian cancer susceptibility genes in a group of 333 patients." *Cancers*. 2018;10 (11): 442.
19. Takagi, M., Yoshida, M., Nemoto, Y., Tamaichi, H., Tsuchida, R., Seki, M. et al. "Loss of DNA damage response in neuroblastoma and utility of a PARP inhibitor." *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2017;109 (11).
20. Couch, F. J., Hart, S. N., Sharma, P., Toland, A. E., Wang, X., Miron, P. et al. Inherited mutations in 17 breast cancer susceptibility genes among a large triple-negative breast cancer cohort unselected for family history of breast cancer. *Journal of clinical oncology*. 2015; 33(4): 304.

References:

1. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A *CA Cancer J Clin*. 2018 Nov; 68(6):394-424.
2. Kaprin A.D., Starinskogo V.V., Shahzadov A.O. The state of cancer care for the population of Russia in 2019. M.: MNI OI P.A. Gerzena. 2020; 239.
3. Ovarian cancer statistics, 2018. Torre LA, Trabert B, DeSantis CE, Miller KD, Samimi G, Runowicz CD, et al. *CA Cancer J Clin*. 2018 Jul; 68(4):284-296
4. Chernobay A. V. Ovarian cancer: pathogenesis, diagnosis, modern aspects of treatment. *Bulletin of problems of biology and medicine*. 2013;1(2).
5. Long K. C., Kauff N. D. Hereditary ovarian cancer: recent molecular insights and their impact on screening strategies. *Curr Opin Oncol*. 2011 Sep;23 (5):526-30.
6. Lyubchenko L.N., Bateneva E.I., Abramov I.S., Emelyanova M.A, Budik Yu.A., Tyulyandina A.S., et al Hereditary breast and ovarian cancer. *Malignant tumors*. 2013; 2 (6).

7. S. Zhang, R. Royer, S. Li, J.R. McLaughlin, B. Rosen, H.A. Risch, et al. Frequencies of BRCA1 and BRCA2 mutations among 1,342 unselected patients with invasive ovarian cancer *Gynecol. Oncol.* 2011; 121(2) : 353-357
8. Ramus, P.A. Harrington, C. Pye, R.A. DiCioccio, M.J. Cox, K. Garlinghouse-Jones, et al. Contribution of BRCA1 and BRCA2 mutations to inherited ovarian cancer *Hum. Mutat.* 2007; 28 (12):1207-1215.
9. Toss A., Tomasello C., Razzaboni E., Contu G., Grandi G., Cagnacci A. et al. Hereditary ovarian cancer: not only BRCA 1 and 2 genes. *BioMed research international.* 2015;2015.
10. Paull, Tanya T., and Rajashree A. Deshpande. "The Mre11/Rad50/Nbs1 complex: recent insights into catalytic activities and ATP-driven conformational changes." *Experimental cell research.* 2014; 329(1): 139.
11. Brandt, S., Samartzis, E. P., Zimmermann, A. K., Fink, D., Moch, H., Noske, A. et al. "Lack of MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) complex detection occurs frequently in low-grade epithelial ovarian cancer." *BMC cancer* 2017; 17(1) : 1-9.
12. Hsu, H. M., Wang, H. C., Chen, S. T., Hsu, G. C., Shen, C. Y., & Yu, J. C. "Breast cancer risk is associated with the genes encoding the DNA double-strand break repair Mre11/Rad50/Nbs1 complex." *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers.* 2007;16 (10): 2024-2032.
13. Kim, H. S., Kim, J. W., Hwang, I. G., Lee, H. S., Kim, W. H. "Expression of DNA Damage Response Markers in Early-Onset or Familial Gastric Cancers." *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP.* 2019; 20(5): 1369.
14. Zhen, J. T., Syed, J., Nguyen, K. A., Leapman, M. S., Agarwal, N., Brierley, K. et al. "Genetic testing for hereditary prostate cancer: Current status and limitations." *Cancer.* 2018;124(15): 3105-3117.
15. Kałużna, E. M., Rembowska, J., Ziółkowska-Suchanek, I., Świątek-Kościelna, B., Gabryel, P., Dyszkiewicz, W., Nowak, J. S. "Heterozygous p. I171V mutation of the NBN gene as a risk factor for lung cancer development." *Oncology letters.* 2015;10 (5): 3300-3304.
16. Simonetti, G., Padella, A., do Valle, I. F., Fontana, M. C., Fonzi, E., Bruno, S. et al. "Aneuploid acute myeloid leukemia exhibits a signature of genomic alterations in the cell cycle and protein degradation machinery." *Cancer.* 2019; 125(5): 712-725.
17. Caminsky, N. G., Mucaki, E. J., Perri, A. M., Lu, R., Knoll, J. H., & Rogan, P. K. et al. "Prioritizing variants in complete hereditary breast and ovarian cancer genes in patients lacking known BRCA mutations." *Human mutation.* 2016 ;37(7): 640-652.
18. Koczkowska, M., Krawczynska, N., Stukan, M., Kuzniacka, A., Brozek, I., Sniadecki, M. et al. "Spectrum and prevalence of pathogenic variants in ovarian cancer susceptibility genes in a group of 333 patients." *Cancers.* 2018;10(11): 442.
19. Takagi, M., Yoshida, M., Nemoto, Y., Tamaichi, H., Tsuchida, R., Seki, M. et al. "Loss of DNA damage response in neuroblastoma and utility of a PARP inhibitor." *JNCI: Journal of the National Cancer Institute.* 2017;109 (11).
20. Couch, F. J., Hart, S. N., Sharma, P., Toland, A. E., Wang, X., Miron, P. et al. Inherited mutations in 17 breast cancer susceptibility genes among a large triple-negative breast cancer cohort unselected for family history of breast cancer. *Journal of clinical oncology.* 2015; 33(4): 304.

Поступила/Received: 27.05.2021

Принята в печать/Accepted: 04.06.2021