

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

FERNANDA ROSA SAWITZKI

**Haplótipos de diferentes SNPs no interior do gene *FLI1*
em indivíduos afetados e não-afetados pelo sarcoma de Ewing**

Porto Alegre, RS
Abril de 2012

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Haplótipos de diferentes SNPs no interior do gene *FLI1* em indivíduos afetados e não-afetados pelo sarcoma de Ewing

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Pós-graduando: FERNANDA ROSA SAWITZKI

Orientadora: CLARICE SAMPAIO ALHO

Porto Alegre, RS

Abril, 2012

Dedico este trabalho aos meus pais, Reinaldo Jorge Sawitzki e Carmen Luiza Damin Rosa Sawitzki, pelo amor, carinho e principalmente por acreditarem no meu potencial e me apoiarem no decorrer de toda minha vida acadêmica. Amo Vocês!

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Clarice Sampaio Alho, por ter orientado este trabalho.

As minhas amigas e colegas Débora Soares Bispo Santos Silva, Elisa De Toni, Pietra Graebin e Juliane Picanço, por todos os conhecimentos compartilhados, pelas conversas, dicas, sugestões e disponibilidade.

Aos demais professores e funcionários da Faculdade de Biociências da PUCRS, que de alguma forma contribuíram nessa caminhada de estudos.

Aos amigos do Laboratório de Genética Humana e Molecular.

À toda minha Família, pelo suporte, apoio e carinho.

RESUMO

Neste estudo, os SNPs rs640098, rs491714, rs611307 no gene *FLI1* foram genotipados em uma amostra de 201 indivíduos da população do sul do Brasil, e em 24 pacientes portadores de Sarcoma Ewing (geograficamente comparado com grupo controle) e 54 de seus familiares, incluindo pais e irmãos. Realizamos estudos de associação, comparando as frequências genóticas do rs640098 e rs491714 e rs611307 no gene *FLI1*, e todas as combinações possíveis entre o genótipo de pacientes Sarcoma de Ewing e grupo controle. Dos três SNPs investigados individualmente, apenas um deles apresentou um resultado significativo quando comparado com o grupo controle; nossa análise não-combinada revelou uma presença significativamente maior de homozigoto A-rs497714 entre os pacientes de Sarcoma Ewing ($p = 0,0065$; Chi quadrado) . Em todos os outros grupos testados, foi notada uma maior taxa de homozigoto A-rs497714 entre os pacientes com Sarcoma de Ewing, independentemente dos outros arranjos e / ou combinações de SNP e haplótipos. Além disso, foram realizados testes de desequilíbrio de transmissão, comparando dados de pacientes portadores de Sarcoma de Ewing e de suas famílias (pais e irmãos), mas nenhum resultado estatisticamente significativo foi encontrado. Em conclusão, o presente estudo fornece evidências estatisticamente fundada de que o genótipo AA-rs497714 *FLI1* pode associado ao sarcoma de Ewing. E que este polimorfismo pode ser clinicamente útil como um potencial marcador genético para o prognóstico de risco para desenvolver este câncer ou para fornecer *insights* no contexto de quebras cromossômicas de tumorigênese no gene *FLI1*.

PALAVRAS-CHAVE

SNP, rs640098, rs497714, rs611307, sarcoma de Ewing.

ABSTRACT

In this study the SNPs rs640098, rs491714, rs611307 into the *FLI1* gene were genotyped in a sample of 201 subjects from southern Brazilian population, in 24 Ewing's sarcoma patients (geographically matched with control group) and 54 of their family members, including parents and siblings. We performed association studies comparing genotypic frequencies of rs640098, rs491714, rs611307 into the *FLI1* gene, and all possible genotype combinations between Ewing's Sarcoma patients and control group. Of the three SNPs investigated individually, only one of them showed a significant result when compared to the control group; our non-combined analysis revealed a significantly higher presence of homozygote A-rs497714 among Ewing's Sarcoma patients ($p=0.0065$; Chi square Test). In all other tested clusters, we always noticed a higher rate of homozygote A-rs497714 among Ewing's Sarcoma patients independent of the other SNP-arrangements and/or haplotype combinations. In addition, we performed transmission disequilibrium tests comparing data from Ewing's Sarcoma patients and from their families (parents and siblings), but no statistically significant result was found. In conclusion, the present study provides evidence statistically founded that the AA-rs497714 *FLI1* genotype can associated with Ewing's sarcoma. And that this polymorphism can be clinically useful as a potential genetic marker to the prognostic of risk to develop this cancer or to provide insights into *FLI1* chromosome breakage context of tumorigenesis.

KEYWORDS

SNP, rs640098, rs497714, rs611307, Ewing's sarcoma.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1- APRESENTAÇÃO DO TEMA	1
1- SARCOMA DE EWING	1
2- TIPOS DE HERANÇA DO SARCOMA DE EWING	2
3- CAUSAS MOLECULARES	2
4- FATORES MOLECULARES ENVOLVIDOS NO MECANISMO DE RISCO AO SARCOMA DE EWING	4
5- SNPS E O SARCOMA DE EWING	5
6- GENE FLI1	5
7- OBJETIVOS	6
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	9
CAPÍTULO 2- ARTIGO CIENTÍFICO	10
CAPÍTULO 3- CONSIDERAÇÕES FINAIS	28
ANEXOS	31

CAPÍTULO 1 - APRESENTAÇÃO DO TEMA

INTRODUÇÃO

1- Sarcoma de Ewing

A família de Tumores de Ewing compreende um espectro de neoplasias de células neuroectodérmicas primitivas que acometem primariamente o tecido ósseo e tecidos moles (Ferman S. Família de Tumores de Ewing: Sarcoma de Ewing e Tumores Neuroectodérmicos Primitivos Periféricos; Askin. Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=345. Acesso em: maio de 2010). O Sarcoma de Ewing ósseo corresponde a 87% dos tumores classificados dentro dessa família, seguido do Sarcoma extra-ósseo (8%) e do tumor neuroectodérmico primitivo periférico (5%) (Horowitz *et al.*, 1997).

O Sarcoma de Ewing foi primeiramente descrito por James Ewing em 1921 como um endotelioma difuso de osso e é considerado altamente maligno e metastático (Randall *et al.*, 2010). É o segundo tumor ósseo mais comum de ocorrer em crianças, adolescentes e jovens adultos, e representa cerca de 10–15% de todos os tumores ósseos primários (Huvos, 1991; Burchill, 2003).

Este sarcoma pode afetar qualquer osso, mas os locais mais comuns são as extremidades inferiores (45%), seguido pela pélvis (20%), extremidades superiores (13%), esqueleto axial e costelas (13%) e face (2%) (Grier, 1997; Burchill, 2003). O femur é o osso mais frequentemente afetado, no entanto, qualquer região óssea pode ser acometida (Burchill, 2003; Forones, 2005). É um sarcoma ligado à etnia, tendo uma distribuição desigual entre as etnias com 96% dos casos ocorrendo em caucasianos, 1,8% em africanos e 2,2% em outras etnias (Parkin *et al.*, 1993).

A incidência do Sarcoma de Ewing é menor que 1 em um milhão nas populações do Este e Sudeste Asiático, países Africanos e em Afro-Americanos. Taxas intermediárias de 1-2 em um milhão são encontradas em Cuba, Porto Rico e em populações hispânicas dos Estados Unidos. Nos países ocidentais, a incidência na população caucasiana é de cerca de 2-3 em um milhão (Tortajada *et al.*, 2005).

Para este sarcoma, um grande fator prognóstico é a presença ou ausência de metástase. Entretanto, a detecção da doença disseminada é baseada no estudo de imagens que apenas revelam lesões macroscópicas, e/ou análise histológica da medula óssea, que é limitada pela falta de marcadores específicos para as células com Sarcoma de Ewing (Fidelia-Lambert *et al.*, 1999). Sendo assim, marcadores cromossômicos seriam de bastante ajuda para um diagnóstico preciso.

2- Tipo de herança do Sarcoma de Ewing

Apesar de algumas causas moleculares já terem sido descritas em relação ao Sarcoma de Ewing, pouco ou quase nada se sabe sobre o tipo de herança dessa doença. Este tipo de câncer já foi descrito entre irmãos, mas isso é raro e essa doença parece não fazer parte das síndromes de câncer familiar (Hutter *et al.*, 1964; Zamora *et al.*, 1986; Burchill, 2003). De acordo com Randall *et al.* (2010), casos de pacientes afetados pelo Sarcoma de Ewing são reportados, na maioria dos casos, como sendo isolados, mas há a citação de três ocorrências publicadas em relação à irmãos serem portadores de Ewing e, interessantemente, todos envolvendo indivíduos do sexo feminino (Randall *et al.*, 2010). O fato de existirem pessoas da mesma família que são irmãos e que são portadores do Sarcoma de Ewing pode implicar uma leve, mas sugestiva contribuição da genética herdada para o risco de desenvolver a doença (Randall *et al.*, 2010).

Outra informação sugestiva de contribuição da genética para o Sarcoma de Ewing pode ser que populações Afro-Caribenhas e Chinesas são menos frequentemente afetadas do que a populações de etnia caucasiana, o que revela o efeito de um *background* genético e de frequências alélicas de suscetibilidade diferencial e dependente da origem étnica (Joyce *et al.*, 1984; Zamora *et al.*, 1986; Burchill, 2003; Randall *et al.*, 2010). Entretanto, dado o limitado número de publicações a respeito desses casos e a falta de DNA genômico para análises, as contribuições ambientais à herança genética devem também ser consideradas no momento de se atribuir as probabilidades de ocorrência do Sarcoma de Ewing.

3- Causas moleculares

O Sarcoma de Ewing é um tumor ósseo desenvolvido a partir da produção de um fator de transcrição aberrante que regula genes envolvidos no fenótipo tumorigênico deste tipo de câncer (Gangwal *et al.*, 2008). Em torno de 88% a 95% dos casos verifica-se a ocorrência de uma translocação entre o gene EWS localizado (lôcus 22q12) e dois membros da família do fator de transcrição *ETS*, o *FLI1* (11q24) ou *ERG* (21q22) (Zucman-Rossi *et al.*, 1997; Rerim, 2000).

A translocação mais frequente envolve os genes *EWS* e *FLI1*, a qual ocorre em aproximadamente 95% dos casos (Kovar, H, 1998.; Sorensen *et al.*, 1993; Zucman *et al.*, 1993; Ozaki *et al.*, 2002).

Essa fusão entre os genes membros das famílias *EWS* e *ETS* é um evento oncogenético chave que ocorre nos tumores de Ewing. O resultado é a formação de um fator de transcrição quimérico aberrante a partir da ligação do aminoácido terminal do *EWS*, que se apresenta

como um fator ativador da transcrição, com a região carboxi-terminal de *FLI1* ou *ERG* (Guillon *et al.*, 2009). Esse fator de transcrição aberrante regula genes envolvidos no fenótipo tumorigênico do Sarcoma de Ewing e apresenta uma atividade transcrricional aumentada quando comparado ao normal *FLI1* (Burchill, 2003; Gangwal *et al.*, 2008).

Segundo Lin *et al.* (1999), formas alternativas dos genes quiméricos existem devido às variações dos locais de quebra cromossômica do *EWS* e *FLI1*, resultando em um grande número de translocações diferentes, ocasionando um grupo de translocações heterogêneo. A forma mais comum, designada 'Tipo 1', consiste nos primeiros 7 exons do *EWS* unidos com exons 6-9 do gene *FLI1*, que ocorrem em aproximadamente 60% dos casos (Figura 1). Dessa forma, Ginsberg *et al.* (1999) investigaram se dois produtos de fusão dos genes alternativos, *EWS/FLI1* e *EWS/ERG*, definiriam diferentes características clínicas. Entretanto, de acordo com os resultados obtidos, nenhuma diferença clínica significativamente diferente foi observada entre os dois grupos.

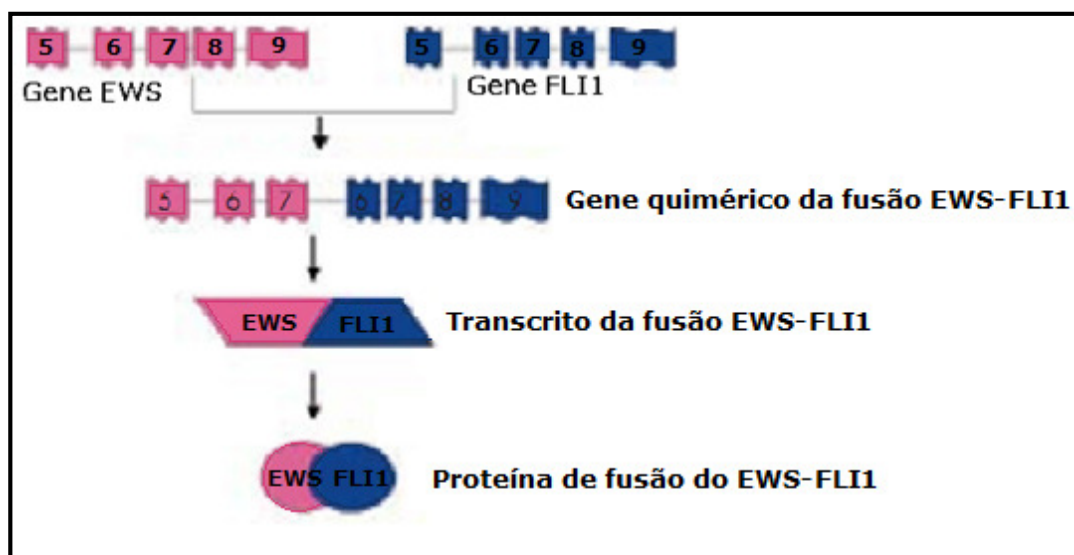


Figura 1 – Representação da forma mais comum dos locais de quebra e fusão dos genes *EWS* e *FLI1*. Traduzido e adaptado de Burchill *et al.*, 2003.

Na família dos tumores do Ewing também podem ocorrer outras variantes, mas em menor escala (Zucman-Rossi *et al.*, 1997; Fidelia-Lambert *et al.*, 1999; Burchill, 2003). Outras anormalidades cromossômicas têm sido descritas, entretanto elas são menos frequentemente descritas do que os rearranjos com os genes *EWS-ETS* e suas implicações clínicas são menos entendidas. Elas consistem em aberrações tanto numéricas quanto estruturais, incluindo ganho dos cromossomos 8 e 12, translocação desbalanceada $t(1;16)$, e deleções no braço curto do cromossomo 1 (Mugneret *et al.*, 1988; Armengol *et al.*, 1997; Kovar *et al.*, 1997; Zielenska *et al.*, 2001; Burchill, 2003).

4- Fatores moleculares envolvidos no mecanismo de risco ao Sarcoma de Ewing

Como mencionado, pouco se conhece sobre os fatores moleculares envolvidos no mecanismo de risco ao Sarcoma de Ewing e a incidência dos tumores de Ewing varia de acordo com a origem étnica, ocorrendo mais frequentemente em Caucasianos do que em Afro-Americanos e Chineses (Ozaki *et al.*, 2002).

Citogeneticamente, ESFTs (Ewing sarcoma family of tumors) são identificados por translocações cromossômicas. Em praticamente todos os casos, a translocação resulta na fusão do domínio amino-terminal de *EWSR1* (*EWS*) ou, em raros casos, o gene relacionado *TLS / FUS* ao domínio de ligação do DNA de um membro da família *ETS*. Em 90% a 95% dos casos, a fusão ocorre entre os genes *EWS* e *FLI1*, resultando na criação de uma oncoproteína de fusão *EWS-FLI1*. Outros membros da família *ETS* que pareiam com *EWSR1* incluem o gene *ERG* em até 10% dos casos e, no restante dos casos, os genes *ETV1*, *E1AF* e *FEV* (Lessnick SL, Dei Tos AP, Sorensen PH, *et al.*, 2009).

A diversidade de combinações entre os pontos de quebra cromossômicos envolvidos, gera uma elevada heterogeneidade no nível molecular. Especificamente, os pontos de quebra no *EWS* podem ocorrer entre introns 7 e 9, e pontos de quebra no *FLI1* podem ocorrer entre introns 3 e 9 (De Alava E, Kawai A, Healey JH, *et al.*, 1998).

Na maioria das vezes, o exon 7 do *EWS* é fundido ao exon 6 (60%) ou exon 5 (20%) do *FLI1*, criando o tipo 1 e o tipo 2 de fusões *EWS-FLI1*, respectivamente. Outras fusões *EWS-FLI1* ocorrem com menos frequência, pelo menos 18 variações de fusão têm sido descritas (De Alava E, Kawai A, Healey JH, *et al.*, 1998).

Em dois estudos publicados em 1996 e 1998 (De Alava E, Kawai A, Healey JH, *et al.*, 1998; Zoubek A, Dockhorn-Dworniczak B, Delattre O, *et al.*, 1996), a fusão *EWS-FLI1* foi associada com significativas diferenças na evolução clínica em pacientes com ESFT localizado. Especificamente, estes estudos revelaram que, em pacientes sem a presença de metástase, as células do tumor possuíam a fusão mais comum (tipo 1 *EWS-FLI1*), e foi observado que havia associação positiva com uma melhor sobrevida global (OS; *overall survival*) nos pacientes com tipo 1 *EWS-FLI1* do que naqueles com fusões não tipo 1. Estes estudos sugeriram juntos que o tipo de fusão *EWS-FLI1* pode ser útil como um meio para classificar pacientes em diferentes grupos de risco no momento do diagnóstico (De Alava E, Kawai A, Healey JH, *et al.*, 1998; Zoubek A, Dockhorn-Dworniczak B, Delattre O, *et al.*, 1996).

5- SNPs e o Sarcoma de Ewing

A grande variação do fenótipo humano é causada por fatores genéticos (intrínseco) e não-genéticos (extrínsecos ou ambientais), tendo muitos fenótipos clínicos um considerável componente genético, como as variantes genômicas de SNPs (*single nucleotide polymorphism*). SNPs são polimorfismos de substituição de um único nucleotídeo existentes na população, onde o alelo mais raro tem uma frequência de pelo menos 1%. Muitas doenças comuns (doenças complexas e multifatoriais) que afetam a população como câncer, doenças cardiovasculares, doenças mentais e diabetes podem ser influenciadas pelos padrões dos SNPs que o indivíduo possui em determinados genes-chave para a doença. Dessa forma, se a expressão de um dado alelo apresenta uma associação com o fenótipo clínico, estão este alelo será encontrado com uma maior frequência entre os indivíduos afetados pelo fenótipo, quando comparados com indivíduos não-afetados (Brookes, 1999).

Para a busca e análise das variantes polimórficas candidatas a terem efeitos no fenótipo, existem metodologias que avançaram muito recentemente e estão disponíveis no domínio público. Os bancos de dados de SNPs existentes atualmente provêm informações detalhadas de SNPs relacionados a genes de diversas espécies, incluindo genes humanos.

O *National Centre for Biotechnology Information* (NCBI) é um dos institutos do *US National Institutes of Health* (NIH) e tem sido o principal local de depósito mundial de dados genômicos dos últimos anos. O banco de dados das variações das sequências de nucleotídeos presente no NCBI é conhecida como *SNP database* (dbSNP) e contém a maior coleção de SNPs disponíveis com o maior número de dados e informações adicionais para cada locus (Phillips, 2007).

Através do site do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), é possível encontrar SNPs de diversos genes que já foram estudados, validados, mas sem nenhum estudo feito em relação a associações clínicas. Em relação ao Sarcoma de Ewing, não há conhecimento em relação ao risco à translocação em pacientes com esta doença.

6- Gene *FLI1*

Esse gene tem como símbolo oficial *FLI1* (Friend leukemia virus integration 1 - *Homo sapiens*) e está localizado no cromossomo 11 na banda citogenética 11q24.1-q24.3 (GeneID 2313) (*FLI1 Homo sapiens*. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2313>. Acesso em: junho de 2010) (Figura 2). Translocações cromossômicas entre esse gene e vários genes que codificam fatores de transcrição resultam na produção de proteínas quiméricas que estão envolvidas na tumorigênese, como no caso do Sarcoma de Ewing.

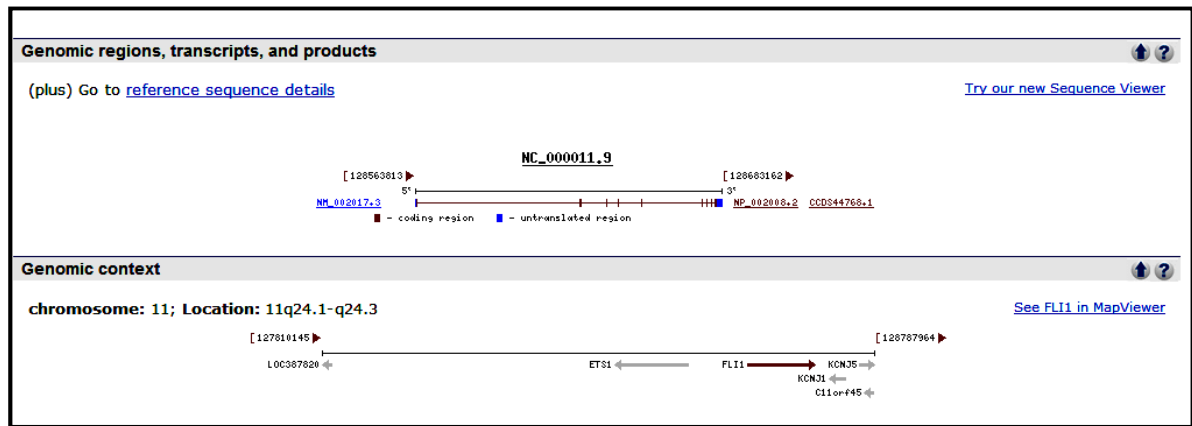


Figura 2 – Representação do gene *FLI1*, suas variantes transcritas e o seu contexto genômico (*FLI1*. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2313>. Acesso em: junho de 2010).

7- OBJETIVO

7.1-Geral

O objetivo deste trabalho foi estudar as variantes polimórficas do tipo SNP no gene *FLI1* em indivíduos afetados e não afetados pelo Sarcoma de Ewing.

7.2-Específicos

1. Selecionar os SNPs presentes no gene *FLI1* mais informativos segundo a frequência dos alelos nas populações e o seu efeito fenotípico.
2. Genotipar os SNPs selecionados em amostras de DNA provenientes de pacientes afetados pelo Sarcoma de Ewing, nos indivíduos aparentados ao afetado (pai, mãe e irmãos), bem como em amostras de DNA proveniente de indivíduos não afetados pelo Sarcoma de Ewing (população controle).
3. Determinar as frequências genotípicas e alélicas dos SNPs do gene *FLI1* no grupo de afetados e na população controle.
4. Comparar as frequências genotípicas, alélicas e haplotípicas entre os grupos de indivíduos afetados e controles.
5. Analisar a segregação de alelos e haplótipos entre geração parental e filial afetada verificando se há desequilíbrio de transmissão entre as gerações.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alignment Map. Disponível em:

<https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=ABGTRResult>.

Acesso em: maio de 2010

Armengol G, Tarkkanen M, Virolainen M, Forus A, Valle J, Bohling T, et al. Recurrent gains of 1q, 8 and 12 in the Ewing family of tumours by comparative genomic hybridisation. *Br J Cancer*. 1997; 75: 1403–09.

Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene*. 1999; 234: 177-86.

Burchill SA. Ewing's sarcoma: diagnostic, prognostic, and therapeutic implications of molecular abnormalities. *J Clin Pathol*. 2003; 56: 96–102.

De Alava E, Kawai A, Healey JH, et al: EWSFLI1 fusion transcript structure is an independent determinant of prognosis in Ewing's sarcoma. *J Clin Oncol* 16:1248-1255, 1998.

Delattre O, Zucman J, Plougastel B, Desmaze C, Melot T, Peter M, et al. Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. *Nature*. 1992; 359: 162–65.

Ferman S. Família de Tumores de Ewing: Sarcoma de Ewing e Tumores Neuroectodérmicos Primitivos Periféricos (Askin). Disponível em:

http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=345. Acesso em: maio de 2010.

Fidelia-Lambert MN, Zhuang Z, Tsokos M. Sensitive Detection of Rare Ewing's Sarcoma Cells in Peripheral Blood by Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction. *Hum Pathol*. 1999; 30(1): 78-80.

FLI1. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2313>. Acesso em: junho de 2010

Gangwal K, Sankar S, Hollenhorst PC, Kinsey M, Haroldsen SC, Shah AA, et al. Microsatellites as EWS/FLI response elements in Ewing's sarcoma. *PNAS*. 2008; 105(29): 10149–154.

Ginsberg JP, Alava E, Ladanyi M, Wexler LH, Kovar H, Paulussen M, et al. EWS-FLI1 and EWS-ERG gene fusions are associated with similar clinical phenotypes in Ewing's sarcoma. *J Clin Oncol*. 1999; 17: 1809-14.

Grier HE. The Ewing family of tumors: Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumors. *Pediatr Clin North Am*. 1997; 44: 991–1104.

Guillon N, Tirode F, Boeva V, Zynovyev A, Barillot E, Delattre O. The Oncogenic EWS-FLI1 Protein Binds *In Vivo* GGAA Microsatellite Sequences with Potential Transcriptional Activation Function. *Plos One*. 2009; 4(3): 1-8.

Horowitz ME, Malawer MM, Woo SY, et al. Ewing's family of tumors: Ewing's sarcoma of the bone and soft tissue and the peripheral primitive neuroectodermal tumors. In: *Principles and Practice of pediatric Oncology*. 3rd ed. Philadelphia: Lippencot-Raven; 1997. p. 831-63.

Hutter RVP, Francis KC, Foote FW. Ewing's sarcoma in siblings. *Am J Surg*. 1964; 107: 598-603.

- Huvos AG. Ewing's sarcoma. In: Bone tumors: diagnosis, treatment and prognosis. 2nd ed. Philadelphia: Sanders; 1991. p. 523-52.
- Joyce MJ, Harmon DC, Mankin HJ, Suit HD, Schiller AL, Truman JT. Ewing's sarcoma in female siblings: a clinical report and review of the literature. *Cancer*. 1984; 53: 1959-62.
- Kovar H. Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors after their genetic union. *Curr Opin Oncol*. 1998; 10: 334-42.
- Kovar H, Jug G, Aryee DN, Zoubek A, Ambros P, Gruber B, Windhager R, Gadner H. Among genes involved in the RB dependent cell cycle regulatory cascade, the p16 tumor suppressor gene is frequently lost in the Ewing family of tumors. *Oncogene*. 1997; 15: 2225-32.
- Lessnick SL, Dei Tos AP, Sorensen PH, et al: Small round cell sarcomas. *Semin Oncol* 36:338-346, 2009.
- Lin PP, Brody RI, Hamelin AC, Bradner JE, Healey JH, Ladanyi M. Differential transactivation by alternative EWS-FLI1 fusion proteins correlates with clinical heterogeneity in Ewing's sarcoma. *Cancer Res*. 1999; 59: 1428-32.
- Mugneret F, Lizard S, Aurias A, Turc-Carel C. Chromosomes in Ewing's sarcoma. II. Nonrandom additional changes, trisomy 8 and der(16)t(1;16). *Cancer Genet Cytogenet*. 1988; 32: 239-45.
- Ozaki T, Schaefer KL, Wai D, Yokoyama R, Ahrens S, Diallo R, et al. Population-based genetic alterations in Ewing's tumors from Japanese and European Caucasian patients. *Ann Onco*. 2002; 13: 1656-64.
- Parkin DM, Stiller CA, Nectoux J. International variations in the incidence of childhood bone tumors. *Int J Cancer*. 1993; 53: 371-76.
- Phillips C. Online Resources for SNP Analysis: A Review and Route Map. *Mol Biotechnol*. 2007; 35: 65-97.
- Randall RL, Lessnick SL, Jones KB, Gouw LG, Cummings JE, Cannon-Albright L, Schiffman JD. Is there a predisposition gene for Ewing's Sarcoma? *J Oncol*. 2010; 2010: 1-6.
- Rerin JS. Analysis of Ewing tumors by Comparative Genomic Hybridization (CGH). Münster: Universidade Westfälische Wilhelms – Faculdade de Medicina; 2000.
- SNP DataBase. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>. Acesso em: abril de 2010.
- Sorensen PH, Liu XF, Delattre O, Rowland JM, Biggs CA, Thomas G, Triche TJ. Reverse transcriptase PCR amplification of *EWS/FLI-1* fusion transcripts as a diagnostic test for peripheral primitive neuroectodermal tumors of childhood. *Diagn Mol Pathol*. 1993; 2: 147-57.
- TaqMan SNP Genotyping Assays. Disponível em: <http://www.appliedbiosystems.com.br>. Acesso em: abril de 2010.
- Tortajada JF, Tornero OB, García JAO, Claudio-Morales L, Castell JG, Perales VM, Casas LM. Factores de riesgo para los tumores óseos malignos pediátricos. *Na Pediatr*. 2005; 63: 537-47.

- Zamora P, Garcia de Paredes ML, Baron GM, Diaz MA, Escobar Y, Ordonez A, Barea FL, Gonzalez JM. Ewing's tumor in brothers: An unusual observation. *Am J Clin Oncol*. 1986; 9: 358-60.
- Zielenska M, Zhang ZM, Ng K, Marrano P, Bayani J, Ramirez OC, et al. Acquisition of secondary structural chromosomal changes in pediatric Ewing sarcoma is a probable prognostic factor for tumor response and clinical outcome. *Cancer*. 2001; 91: 2156-64.
- Zoubek A, Dockhorn-Dworniczak B, Delattre O, et al: Does expression of different EWS chimeric transcripts define clinically distinct risk groups of Ewing tumor patients? *J Clin Oncol* 14:1245-1251, 1996.
- Zucman J, Melot T, Desmaze C, Ghysdael J, Plougastel B, Peter M, et al. Combinatorial generation of variable fusion proteins in the Ewing's family of tumours. *EMBO J*. 1993; 12: 4481-87.
- Zucman-Rossi J, Batzer MA, Stoneking M, Delattre O, Thomas G. Interethnic polymorphism of EWS intron 6: genome plasticity mediated by Alu retroposition and recombination. *Hum Genet*. 1997; 99: 357-63.

CAPÍTULO 2 - ARTIGO CIENTÍFICO

[Manuscrito submetido ao periódico "Journal of Human Genetics"]

TITLE

EWING'S SARCOMA: ANALYSIS OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM IN THE *FLI1* GENE

RUNNING TITLE

SNPs and Ewing's Sarcoma.

AUTHORS, AFFILIATIONS AND ADDRESSES

Fernanda R. Sawitzki: Laboratory of Molecular and Human Genetics, Faculty of Biosciences, PUCRS, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

Deborah S. B. S. Silva: Laboratory of Molecular and Human Genetics, Faculty of Biosciences, PUCRS, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

Elisa C. De Toni: Laboratory of Molecular and Human Genetics, Faculty of Biosciences, PUCRS, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

Pietra Graebin: Laboratory of Molecular and Human Genetics, Faculty of Biosciences, PUCRS, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

Juliane B. Picanço: Laboratory of Molecular and Human Genetics, Faculty of Biosciences, PUCRS, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

Ana Lucia Abujamra: Cancer Research Laboratory, University Hospital Research Center (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil; National Institute for Translational Medicine, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil; Children's Cancer Institute and Pediatric Oncology Unit, Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil; Medical Sciences Program, School of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul.

Caroline B. de Farias: Cancer Research Laboratory, University Hospital Research Center (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil; National Institute for Translational Medicine, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil; Children's Cancer Institute and Pediatric Oncology Unit, Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

Rafael Roesler: Laboratory of Molecular Neuropharmacology, Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil; Cancer Research Laboratory, University Hospital Research Center (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil; National Institute for Translational Medicine, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

Algemir L. Brunetto: Cancer Research Laboratory, University Hospital Research Center (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil; National Institute for Translational Medicine, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil; Children's Cancer Institute and Pediatric Oncology Unit, Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

Clarice S. Alho: Laboratory of Molecular and Human Genetics, Faculty of Biosciences, PUCRS, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

CORRESPONDING AUTHOR

Clarice Sampaio Alho: csalho@pucrs.br; Phone/Fax: (+55) (51) 3320-3568.

ABSTRACT

In this study the SNPs rs640098, rs491714, rs611307 into the *FLI1* gene were genotyped in a sample of 201 subjects from southern Brazilian population, in 24 Ewing's sarcoma patients (geographically matched with control group) and 54 of their family members, including parents and siblings. We performed association studies comparing genotypic frequencies of rs640098, rs491714, rs611307 into the *FLI1* gene, and all possible genotype combinations between Ewing's Sarcoma patients and control group. Of the three SNPs investigated individually, only one of them showed a significant result when compared to the control group; our non-combined analysis revealed a significantly higher presence of homozygote A-rs497714 among Ewing's Sarcoma patients ($p=0.0065$; Chi square Test). In all other tested clusters, we always noticed that a higher rate of homozygote A-rs497714 among Ewing's Sarcoma patients independently of the other SNP-arrangements and/or haplotype combinations. In addition, we performed transmission disequilibrium tests comparing data from Ewing's Sarcoma patients and from their families (parents and siblings), but no statistically significant result was found.

In conclusion, the present study provides evidence statistically founded that the AA-rs497714 *FLI1* genotype can associated with Ewing's sarcoma. And that this polymorphism can be clinically useful as a potential genetic marker to the prognostic of risk to develop this cancer or to provide insights into *FLI1* chromosome breakage context of tumorigenesis.

KEYWORDS

SNP, rs640098, rs497714, rs611307, Ewing's sarcoma.

INTRODUCTION

Chromosomal translocations, which create fusion oncogenes, have long been recognized as cause of human cancers, such as leukemia and sarcomas²². Ewing's sarcoma (ES) is the second most common bone tumor after osteosarcoma in children. ES was initially reported by James Ewing who differentiated the former from the latter. The term "Ewing sarcoma family of tumors" (ESFT) is used to describe a heterogeneous group of small blue round cell neoplasms of neuroectodermal origin^{8, 14}. These tumors grow in children and young adults; and comprise approximately 3% of all pediatric malignancies, and about 10–15% of all primary bone tumors^{4, 16}. It is a rare malignant mesenchymal tumor with approximately 200 new cases diagnosed yearly in the United States¹⁵. Of these cases, 90% occur in the first and second decade of life. Ewing's sarcoma is more common in Caucasian populations, with a slight predominance in male subjects¹⁰. Its incidence is about 1-3 patients per million²⁷.

In the majority of Ewing's tumors, the N-terminal portion of *EWS* (Ewing's Sarcoma protein; codified by *EWS* gene in chromosome 22) becomes fused to the C-terminal portion of *FLI1* (Friend leukemia integration site 1 protein; codified by *FLI1* gene in chromosome 11), which includes an *ETS* (E-twenty six) family DNA binding domain⁷. ESFT are defined by these characteristic chromosomal translocation t(11;22) that result in the fused protein product *EWS-FLI1*. This translocation, that explains 95% of ES tumors, occurs when breaks in central exons of the *EWS* gene (locus 22q12), and in the central exons of an *ETS* family gene; either *FLI1* (locus 11q24) or *ERG* (*v-ets* erythroblastosis virus E26 oncogene homolog; locus 21q22), t(11;22) and t(21;22), respectively^{7,8}. The *EWS-FLI1* fused transcripts are found in about 90% of cases, while other fusion transcripts are found less frequently.

The *EWS-FLI1* chimeric protein promote tumor growth by functioning as an aberrant transcription factor, targeting genes involved in cell's cycle regulation, metabolism, angiogenesis, intracellular signaling; and transcriptional modulation. The resultant fusion protein also interacts with the spliceosome, thereby altering posttranscriptional mRNA splicing and cellular protein expression⁹. Although 13 different *EWS-FLI1* chimeric transcripts have been identified, the most common are the called types 1 and 2, which are resulting from the junction between exon 7 of the *EWS* gene and exon 6 or 5 of the *FLI1* gene, respectively³². Into the *FLI1* gene breakpoint region, between exons 5 and 6, has been described a considerable number of single nucleotide polymorphisms (SNPs) which never been tested.

Little is known about the *FLI1* gene breaking region. Our hypothesis is that some sequences could promote higher chromosomal break susceptibility. Here, we investigated SNPs into the *FLI1* gene breaking region in a healthy subjects' population and in Ewing's sarcoma patients.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

Our control subjects were 201 apparently healthy DNA donors from South Brazilian population. Southern Brazil is composed by a singular genetic background: majority of subjects with European origin (Portuguese, Italians, Spanish, and Germans ancestry) and a small amount of individuals with African traits contributing to their genetic pool^{24, 28}. We also enrolled in this study 24 Ewing's sarcoma patients (geographically matched with control group) and 54 of their family members, including parents and siblings. This study was approved by Ethics Committee (Protocol # 11/05422), and informed consent was obtained from all participants.

The Ewing's sarcoma patients were diagnosed in the Pediatric Oncology Department, Porto Alegre Clinic Hospital (HCPA). Of the 24 patients, 14 (58.3%) are female and 10 (41.7%) are male, median age of 11, range from 1 to 21 years old. The clinic diagnostic was confirmed by X-rays images, exploratory surgeries, or cell biopsies of muscle, tumor, bone marrow and/or cerebrospinal fluid obtained from lumbar puncture. The majority of tumors were located in lower extremity bones.

Selection of SNPs

The selection of SNPs was based in three criteria: SNP inside the *FLI1* gene break point region; SNP that had been validated and/or functionally tested; and SNP described in HapMap dbSNP (SNP DataBase – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) with rare allele frequency $\geq 1\%$ in populations of European or Caucasian ethnicity. From 620 *FLI1* SNPs, we preselected 20 and submitted them to TaqMan® SNP Genotyping Assays protocols (<http://www.appliedbiosystems.com.br>). Finally, for this study we selected three as major candidates *FLI1* SNPs: rs640098 (intron 5, A>G), rs497714 (intron 5, A>C) and rs611307 (intron 6, C>T) (Figure 1).

FLI1 SNP Genotyping

DNA was extracted from the blood cells following the protocol of Lahiri and Nurnberger (1991). Genotyping was performed by TaqMan® assay for allelic discrimination using the Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster, CA., EUA; Life Technologies Corporation, USA) and analyzed using the allelic discrimination endpoint analysis mode of the Sequence Detection software package, SDS Version 1.3.1. We used a quality control system to ensure genotyping accuracy: sequencing verification of the DNA amplified fragment, black controls, and repetitions. The sequencing was performed in 10% of the samples for each SNP in order to ensure the reliability of the first result. The primers used to amplify the targeted regions were design using the Primer3 algorithm (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>) and are presented in Table 1. Amplification of samples was performed in a final volume of 25µl reaction containing 0.1-1ng of DNA in 1µL, 12,5µL of TaqMan Universal PCR MasterMix (Applied Biosystems, Foster, CA., EUA), 1µL of 10 pmol/µL upstream and downstream primers and Milli-Q water. PCR was performed on the Veriti Thermal Cycler (Life Technologies Corporation, USA) using the following conditions: predenaturation at 95°C for 10 min, followed by 34 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 60°C for 30 s and extension at 72°C for 30 s, and a final extension at 72°C for 5 min. PCR products were purified using ethanol precipitation. Sequencing was conducted under BigDye™ terminator cycling conditions and performed using Automatic Sequencer ABI 3730XL (Applied Biosystems, Foster, CA., EUA; Life Technologies Corporation, USA).

Statistical analysis

Using Fisher's or Pearson's Chi-Square Test; we compared genotype and allele frequencies amongst groups, and tested the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE). Haplotypes were assembled using Phase software v 2.1.1^{30,31} and Arlequin software v 3.5.x¹¹. For genotype comparisons between patients and control group, we tested the three genotypes independently and also using combinations with the rarest allele homozygote plus heterozygote *versus* the wild allele homozygote or the wild allele homozygote plus heterozygote *versus* the rarest allele homozygote. For an association study, we tested all possible haplotype constructions yet. Transmission Disequilibrium Test (TDT) was performed to determine if there was a presence of genetic linkage between allelic inheritance and Ewing's sarcoma. A p-value <0.05 was assumed as significant in all tests conducted.

RESULTS AND DISCUSSION

Three SNPs (rs640098, rs491714, rs611307) in the *FLI1* gene were genotyped in sample of subjects from southern Brazil. All SNPs were in Hardy-Weinberg equilibrium ($p > 0.05$; Chi-Square Test). Genotypic and allelic frequencies between southern Brazilian controls were also compared with European, African and Asian populations from HAPMAP project (Table 2). Through this analysis, it was found in all the SNPs that were analyzed similar frequencies to Europeans and significant differences were found when Brazilian controls were also compared with Africans. The genotypic and allelic frequencies that were found of rs640098 and rs611307 were also similar to Asians. This highlights the particularities of the southern Brazilian population, which is mostly composed of a singular genetic background: majority of subjects with European origin (Portuguese, Italians, Spanish, and Germans ancestry) and a small amount of individuals with African and Asian traits contributing to their genetic pool^{24, 28}. This result illustrates the importance of a control group population, through this group we can compare more accurately the events that are occurring with our patients.

It was also performed association studies comparing genotypic frequencies of rs640098, rs497714, rs611307, into the *FLI1* gene and all possible genotype combinations between Ewing's Sarcoma patients and control group, to investigate if some SNP or SNP-arrangement could have different incidence in affected individuals. Of the three SNPs investigated individually, only one of them showed a significant result when compared to the control group (Table 3). Our non-combined analysis revealed a significantly higher presence of homozygote A-rs497714 among Ewing's Sarcoma patients ($p = 0.0065$; Chi square Test). When we conducted a grouped analysis with all genotypes of all three SNPs (possible two-to-two or three-to-three SNP-arrangements inheritance and/or haplotype combinations) to see if a combined heritage could present some synergistic effect on the disease, we could not detect a more important significant result (all $p > 0.05$; Chi-Square Test). In all tested clusters, were always noticed a higher rate of homozygote A-rs497714 among Ewing's Sarcoma patients independent of the other SNP-arrangements and/or haplotype combinations.

In addition, to examine if some SNP, SNP-arrangement and/or haplotype combinations could have been preferentially inherited by affected subjects, we performed transmission disequilibrium tests comparing data from Ewing's Sarcoma patients and from their families (parents and siblings). Figure 2 shows this family study, no statistically significant result was found (individually rs640098: $p = 0.19$; rs491714: $p = 0.45$; rs611307: $p = 0.29$; Transmission Disequilibrium Test) nevertheless this test is appropriate to this investigation⁶.

Finally, here we find that the AA-rs497714 *FLI1* genotype was significantly higher in patients with Ewing's Sarcoma phenotype. Complex diseases like Ewing's Sarcoma are caused by many intrinsic (genetics) and extrinsic (way of life) factors, and each factor alone has a little and particular effect.

It is known that translocations may occur in many cancers; chromosomes break and attach to other chromosomes, resulting in rearrangement or recombination. There are several known causes of chromosome breakage that may be applicable to fragile sites^{5, 21, 23}. The discovery of several types of natural fragile sites on chromosomes and the characterization of associated deletions, duplications, and translocations, has revealed potential mechanisms for fragility and for the chromosomal rearrangements that follow. An understanding of these events provides insight into the generation of cancer¹².

There are many documented regions in the human chromosome that appear to be more prone to breakage and subsequent rearrangement than the average sequence. Human "fragile sites" are defined as regions that appear as gaps or breaks on metaphase chromosomes at a higher than average frequency^{3, 25, 29}. Fragile sites have been divided into two categories, "rare" and "common". Although not classified as rare or common fragile sites by cytogenetic criteria, a number of other sequences have been identified that are breakage-prone regions because they cause chromosome rearrangements in vivo or cause chromosome breakage as assessed by other types of assays. One of the most frequently occurring translocations in the human germ line is between specific loci on chromosome 11 and 22. Sequences on both chromosomes at the translocation site contain palindromic AT-rich repeats (~90% A/T) that can form a large cruciform structure^{18, 19}. Interestingly, we observed the homozygosity to A-rs497714 *FLI1* allele as associated with Ewing's Sarcoma phenotype; the rs497714 flanking region could be affected by the C>A change.

One single chromosome 11/22 fused is enough to initiate the tumorigenesis, thus theoretically one single chromosome change (heterozygosity) would be sufficient to predispose the patient to sarcoma. Based on this, we can believe that the AA-rs497714 / Ewing's Sarcoma phenotype association may be involved with other factors rather than with a direct chromosome break. Deletions, duplications, inversions, or other rearrangements, recombination between homologous sequences also results in chromosome break and creation of fusion genes. Sequence homology between members of gene families or pseudogenes results in such rearrangements. Several hemoglobin variants containing fused or hybrid globin chains have been described. Hemoglobin Lepore (Hb Lepore) was the first to be reported by and is an example of gene fusion resulting from the deletional removal of intervening DNA sequence¹³.

Multiple mutations are present in most human tumors, and these genetic modifications appear to be necessary to produce and select premalignant, malignant, and metastatic cells. Destabilization of genes in cancer could be explained by pre-existing hot spots or by creation of new hot spots by the rearrangements themselves¹².

A recombination hotspot-binding protein, translin, which is associated with chromosome translocations and binds to consensus sequences at breakpoint junctions of chromosomal translocations in many lymphoid malignancies, was reported by Aoki *et al.* (1995)². ReHF-1, a recombination hot spot-associated factor specifically recognizes novel target sequences at the

sites of interchromosomal rearrangements in T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL)¹⁷. Nuclear proteins have been identified that bind to target sequences within the recombination hot spot regions of the Bcl-2 oncogene that is involved in rearrangements associated with follicular lymphomas¹. These proteins appear to be similar to ReHF-1. Nuclear proteins were also shown to bind to the recombination hot spot region of the retinoic acid receptor α gene on chromosome 17²⁶, which along with the PML gene on chromosome 15 is involved in the 15;17 translocations found in acute promyelocytic leukemia.

To search for candidate genetic markers to understand a complex disease is an extremely difficult and arduous task. Our work has limitations because we only studied a single segment of the *FLI1* gene, but it brought a very important result in the Ewing's Sarcoma scenario. Even if the effect of the AA-rs497714 *FLI1* genotype is small; it was strong enough to appear given the conditions of our work. Thus, this finding provides one more new information about the effect of *FLI1* gene SNPs on tumor condition and we could hypothesize that the A-rs497714 *FLI1* variant in homozygosis apply a negative effect on cellular function. Since *EWS/FLI* is a key translocation in Ewing's sarcoma, it is plausible to suggest the rs497714 *FLI1* SNP as a candidate to understand the *FLI1* breakage susceptibility, even though it is a common and non functional polymorphic variation.

In conclusion, the present study provides evidence statistically founded that the AA-rs497714 *FLI1* genotype can be associated with Ewing's sarcoma. And that this polymorphism can be clinically useful as a potential genetic marker to the prognostic of risk to develop this cancer or to provide insights into *FLI1* chromosome breakage context of tumorigenesis.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by FAPERGS and Instituto do Câncer Infantil do Rio Grande do Sul. Deborah Soares Bispo Santos Silva, Fernanda Rosa Sawitzki, Juliane Bentes Picanço and Pietra Graebin are supported by CAPES. We would also like to thank Dr. Diógenes S. Santos, Dr. Luiz Augusto Basso and Ana Cristina de O. Dias.

CONFLICT OF INTEREST

None declared.

REFERENCES

- 1-Aoki, K., K. Nakahara, C. Ikegawa, M. Seto, T. Takahashi, J. Minowada, J.L. Strominger, R.T. Maziarz, and M. Kasai. Nuclear proteins binding to a novel target sequence within the recombination hotspot regions of Bcl-2 and the immunoglobulin DH family. *Oncogene* **9**. 1109–1115(1994).
- 2-Aoki, K., K. Suzuki, T. Sugano, T. Tasaka, K. Nakahara, O. Kuge, A. Omori, and M. Kasai. A novel gene *Translin* encodes a recombination hotspot binding protein associated with chromosome translocations. *Nature Genet.* **10**: 167–174 (1995).
- 3-Arlt, M. F., B. Xu, S. G. Durkin, A. M. Casper, M. B. Kastan, and T. W. Glover: BRCA1 Is Required for Common-Fragile-Site Stability via Its G2/M Checkpoint Function. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 6701-6709 (2004)
- 4-Burchill, S.A. Ewing's sarcoma: diagnostic, prognostic, and therapeutic implications of molecular abnormalities. *J Clin Pathol*, **56**. 96–102 (2003).
- 5-Carr, A. M.: Checking that replication breakdown is not terminal. *Science* **297**, 557-8 (2002)
- 6-Cox, A., Camp, N.J., Cannings, C., di Giovine, F.S., Dale, M., Worthington, J., John, S., Ollier, W.E., Silman, A.J., Duff, G.W. Combined sib-TDT and TDT provide evidence for linkage of the interleukin-1 gene cluster to erosive rheumatoid arthritis. *Hum. Mol. Genet.* **8**(9), 1707-1713 (1999).
- 7-Delattre, O., Zucman, J., Plougastel, B., Desmaze, C., Melot, T., Peter, M., et al. Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. *Nature*, **359**. 162–65 (1992).
- 8-Delattre, O., Zucman, J. T. Melot, Sastre Garau, X., Zucker, J.M., Gilbert, M. L., et al. The Ewing family of tumors – a subgroup of small-round-cell tumors defined by specific chimeric transcripts. *N Engl J Med.* **331**. 294–299 (1994).
- 9-Erkizan, H.V., Uversky, V.N., Toretsky, J.A. Oncogenic partnerships: EWS-FLI1 protein interactions initiate key pathways of Ewing's sarcoma. *Clin Cancer Res*, **16**. 4077–83 (2010).
- 10-Esiashvili, N., Goodman, M. & Marcus, R.B. Changes in incidence and survival of Ewing sarcoma patients over the past 3 decades: surveillance epidemiology and end results data. *J Pediatr Hematol Oncol*, **30**. 425–430 (2008).
- 11-Excoffier, L., Lischer, H.E.L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour*, **10**. 564-567 (2010).
- 12-Freudenreich, C.,H. Chromosome fragility: molecular mechanisms and cellular consequences. *Front Biosci*, **12**. 4911-24 (2007).
- 13-Gerald, P. S. & Dimond, L. K. The diagnosis of thalassemia trait by starch block electrophoresis of the hemoglobin. *Blood* **13**. 61-69 (1958).
- 14-Grier, H.E. The Ewing family of tumors. Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumors. *Pediatr Clin North Am*, **44**. 991–1004 (1997).

- 15-Gurney, J.G., Swensen, A., Bulterys, M. Malignant bone tumors. Cancer incidence and survival among children and adolescents. United States SEER program, 1975–1995. Bethesda: Cancer Statistics Branch of the National Cancer Institute; *NIH*, **99-4649**. 99–110 (1999).
- 16-Huvos, A.G. in *Bone tumors: diagnosis, treatment and prognosis*. 2nd ed. 523–52 (Sanders, Philadelphia, 1991).
- 17-Kasai, M., K. Aoki, Y. Matsuo, J. Minowada, R.T. Maziarz, and J.L. Strominger. Recombination hotspot associated factors specifically recognize novel target sequences at the site of interchromosomal rearrangements in T-ALL patients with t(8;14)(q24;q11) and t(1;14) (p32;q11). *Int. Immunol.* **6**: 1017–1025(1994).
- 18-Kurahashi, H., and B. S. Emanuel: Long AT-rich palindromes and the constitutional t(11;22) breakpoint. *Hum Mol Genet* **10**, 2605-17 (2001).
- 19-Kurahashi, H., H. Inagaki, K. Yamada, T. Ohye, M. Taniguchi, B. S. Emanuel, and T. Toda: Cruciform DNA structure underlies the etiology for palindrome-mediated human chromosomal translocations. *J Biol Chem* **279**, 35377-83 (2004).
- 20-Lahiri, D.K., Nurnberger, J.I. Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res*, **19**. 5444 (1991).
- 21-Michel, B., S. D. Ehrlich, and M. Uzzell: DNA doublestrand breaks caused by replication arrest. *Embo J* **16**, 430-8 (1997).
- 22-Mitelman, F., Johansson, B. & Mertens, F. The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nat. Rev. Cancer.* **7**, 233–245 (2007).
- 23-Osborn, A. J., S. J. Elledge, and L. Zou: Checking on the fork: the DNA-replication stress-response pathway. *Trends Cell Biol* **12**, 509-16 (2002).
- 24-Parra, F.C., Amado, R.C., Lambertucci, J.R., Rocha, J., Antunes, C.M., Pena S.D. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**. 177-182 (2003).
- 25-Richards, R. I.: Fragile and unstable chromosomes in cancer: causes and consequences. *Trends in Genetics* **17**, 339-345 (2001).
- 26-Tashiro S., Z.W. Wang, N. Kotomura, M. Eguchi, O. Niwa, K. Ueda, and N. Kamada. Nuclear proteins binding to the recombination hotspot region of the retinoic acid receptor alpha gene. *Cancer Res. Ther. Control* **4**: 293 (1995).
- 27-Tortajada, J.F., Tornero, O.B., García, J.A.O., Claudio-Morales, L., Castell, J.G., Perales, V.M., Casas, L.M. Factores de riesgo para los tumores óseos malignos pediátricos. *Na Pediatr*, **63**. 537-47 (2005).
- 28-Salzano F.M. and Freire-Maia, N. Problems in human biology. A study of Brazilian populations. Detroit: Wayne State University Press (1970).
- 29-Schwartz, M., E. Zlotorynski, M. Goldberg, E. Ozeri, A. Rahat, C. le Sage, B. P. Chen, D. J. Chen, R. Agami, and B. Kerem: Homologous recombination and nonhomologous endjoining repair pathways regulate fragile site stability. *Genes Dev* **19**, 2715-26 (2005)

- 30-Stephens, M., Smith, N., Donnelly, P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet*, **68**. 978-989 (2001).
- 31-Stephens, M., Donnelly, P. A comparison of Bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am J Hum Genet*, **73**. 1162-1169 (2003).
- 32-Zucman, J., Melot, T., Desmaze, C., Ghysdael, J., Plougastel, B., Peter, M., et al. Combinatorial generation of variable fusion proteins in the Ewing's family of tumours. *EMBO J*, **12**. 4481-87 (1993).

TABLES

Table 1. Primer sequences used to amplify the targeted regions of single nucleotide polymorphisms (SNPs) designing by Primer3 algorithm (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>) and polymerase chain reaction data.

SNP	Primer Sequence (5'-3')	Annealing Temperature	Product Length
rs640098	Upstream: aggcagcctctccttctagg Downstream: gcacacatgaattccacagg	60°C	164 bp
rs497714	Upstream: aaagcaggcagttgtccaag Downstream: gctgaggttaccagcaggac	60°C	144 bp
rs611307	Upstream: ctcccaaagactggaccta Downstream: ggaagaaactgcaggtgagc	60°C	149 bp

bp; base pair

Table 2. Genotypic and allelic frequencies of rs640098, rs497714, and rs611307 SNPs in control subjects from Southern Brazilian sample and their comparison with data from three populations investigated by HAPMAP (for more information about HAPMAP, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=640098, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=497714; and http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=611307).

	Controls N (%)	HAPMAP ¹		
		European N (%)	African N (%)	Asian ² N (%)
rs640098	N=205	N=226	N=226	N=258
AA	26 (12.7)	32 (14.2)	0 (0)	44 (17.0)
AG	100 (48.8)	128 (56.6)	4 (1.8)	132 (51.2)
GG	79 (38.5)	66 (29.2)	222 (98.2)	82 (31.8)
P		0.1277	<0.001	0.2152
A	152 (37.1)	192 (42.5)	4 (0.9)	220 (42.6)
G	258 (62.9)	260 (57.5)	448 (99.1)	296 (57.4)
P		0.1214	<0.001	0.0863
rs497714³	N=201	N=226	N= 226	N= 258
AA	30 (14.9)	32 (14.2)	90 (39.8)	68 (26.4)
AC	98 (48.7)	88 (38.9)	106 (46.9)	132 (51.2)
CC	73 (36.3)	106 (46.9)	30 (13.3)	58 (22.4)
P		0.0727	<0.001	<0.001
A	158 (39.3)	152 (33.6)	286 (63.3)	268 (51.9)
C	244 (60.7)	300 (66.4)	165 (36.7)	248 (48.1)
P		0.0851	<0.001	<0.001
rs611307	N=202	N=226	N=226	N=258
CC	88 (43.6)	100 (44.2)	220 (97.3)	128 (49.6)
CT	92 (45.5)	108 (47.8)	6 (2.7)	110 (42.6)
TT	22 (10.9)	18 (8)	0 (0)	20 (7.8)
P		0.5759	<0.001	0.3129
C	268 (66.3)	308 (68.1)	446 (98.7)	366 (70.9)
T	136 (33.7)	144 (31.9)	6 (1.3)	150 (29.1)
P		0.5741	<0.001	0.1351

¹Submitter Population Handle / ID: CSHL-HAPMAP / HapMap.²We considered both Asian populations HapMap-HCB (N=86) and HapMap-JPT (N=172) together.³The HapMap project notices rs497714 SNP as G>T instead C>A. All comparisons were made between Southern Brazilian Controls data *versus* data from each HAPMAP populations by Pearson's Chi-Square Test.

Table 3. Comparison genotype group frequencies between Ewing's sarcoma patients and Controls.

SNP	Genotype	Controls N (%)	Patients N (%)	P Value
rs611307	CC+CT	180 (89.0)	20 (83.0)	0.1592
	TT	21 (11.0)	4 (17.0)	
rs611307	CC	88 (43.5)	9 (62.5)	0.5783
	CT+TT	114 (56.5)	15 (37.5)	
rs640098	AA+AG	126 (61.5)	16 (66.7)	0.6192
	GG	79 (38.5)	8 (33.3)	
rs640098	AG+GG	175 (87.0)	20 (83.0)	0.2021
	AA	26 (13.0)	4 (17.0)	
rs497714	AA+AC	128 (63.7)	15 (62.5)	0.9241
	CC	73 (36.3)	9 (37.5)	
rs497714	AC+CC	172 (85.0)	15 (62.0)	0.0065*
	AA	29 (15.0)	9 (38.0)	

* p<0.01.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Three selected *FLI1* SNPs: 1-rs497714, 2-rs640098, and 3-rs611307 Identified using Alignment Map. Available in: <https://www.appliedbiosystems.com>.

Figure 2. Genotypes of 3 SNPs of patients with Ewing's sarcoma and their relatives. The figure shows the pedigree of families affected by Ewing's sarcoma (patients and patients' parents and sibling) with the result of their genotype; from top to bottom is showed rs640098, rs497714 and rs611307.

FIGURE 1.

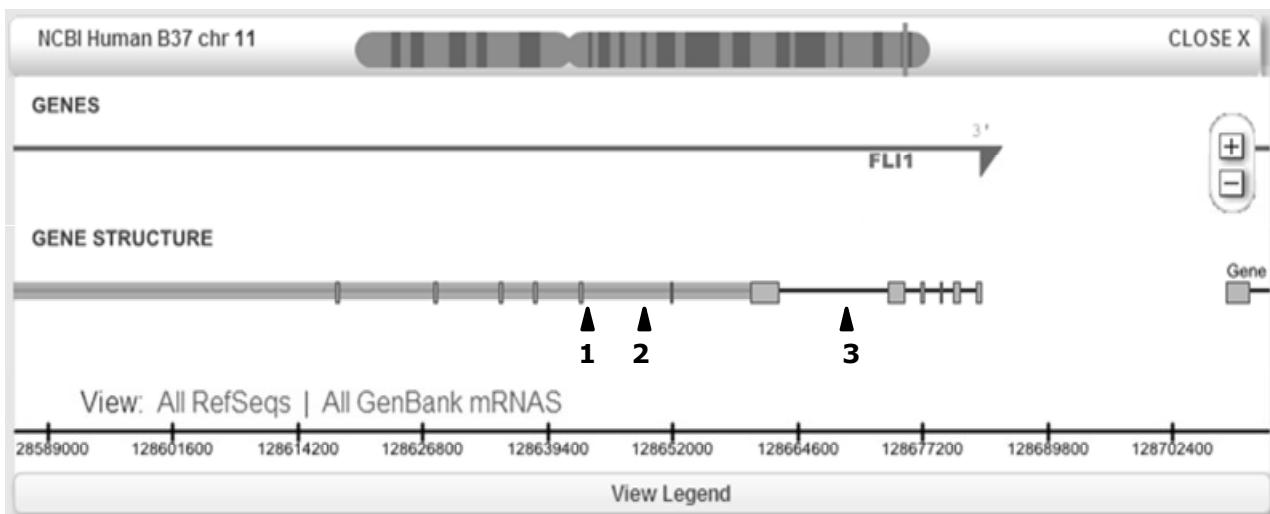
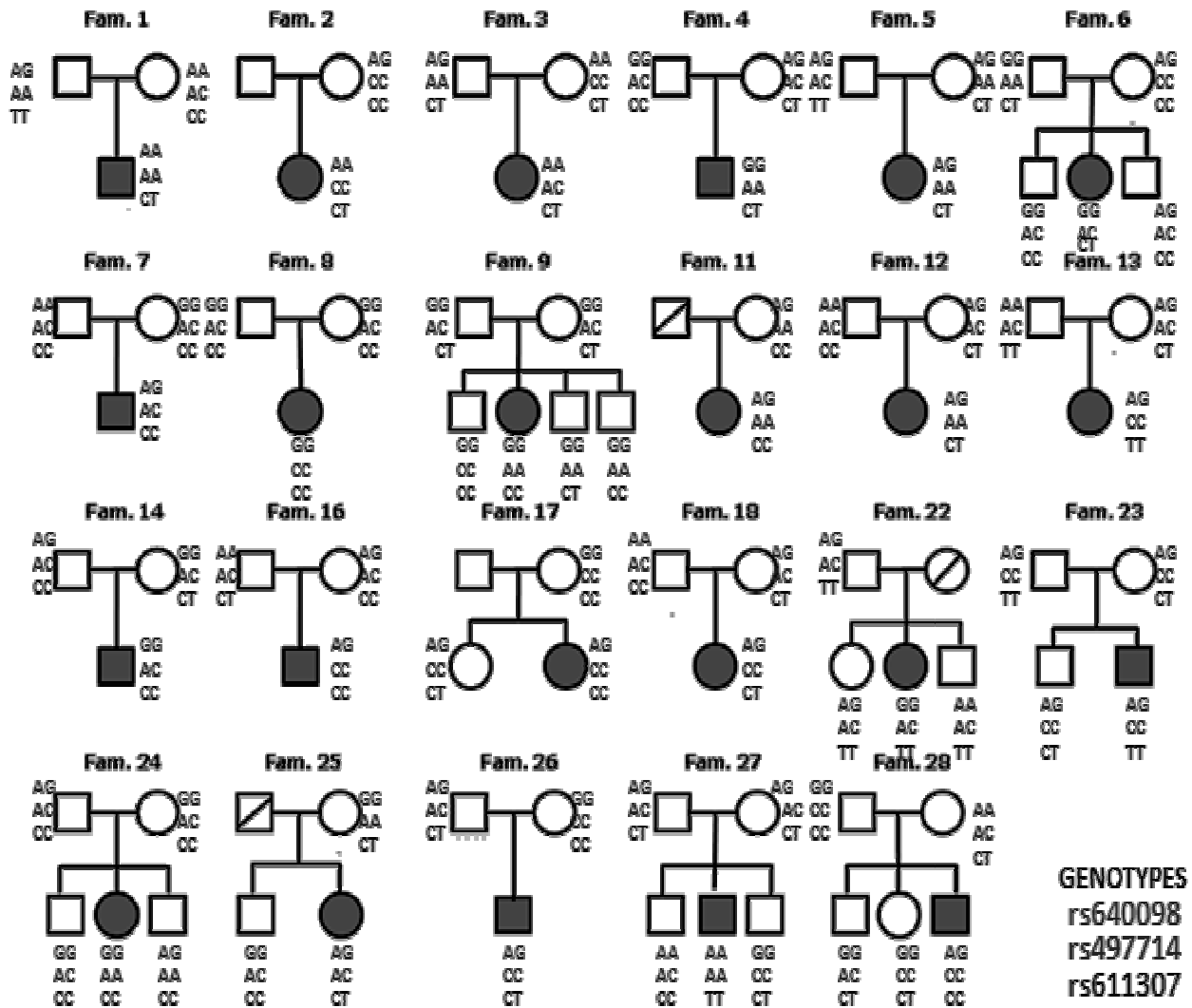


FIGURE 2



CAPÍTULO 3 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

No Sarcoma de Ewing é recorrente a quebra e a translocação cromossômica. Dentre os genes envolvidos nesta translocação está o gene *FLI1*, localizado no cromossomo 11, pouco se sabe a respeito da região de quebra deste gene e quais sequências poderiam levar a uma maior susceptibilidade a quebra cromossômica.

Sabe-se que translocações podem ocorrer em muitos tipos de câncer; cromossomos quebram e se ligam a outros cromossomos, resultando em rearranjos ou recombinações. Existem várias causas conhecidas de quebras cromossômicas que podem ser aplicáveis a sítios frágeis. A descoberta de vários tipos de sítios frágeis naturais no cromossomo e a caracterização de deleções, duplicações, e translocações associadas, revelou mecanismos potenciais para a fragilidade e para os rearranjos cromossômicos. A compreensão desses eventos fornece informações sobre a geração do câncer. Há muitas regiões documentadas no cromossomo humano que parecem ser mais propensas a quebras e subsequente rearranjo. Uma das translocações que ocorrem mais frequentemente situa-se entre lócus específicos no cromossomo 11 e 22.

Atualmente sabe-se que as recombinação meióticas no genoma não ocorrem aleatoriamente, elas tendem a se concentrar em *hot spots*, regiões com taxas relativamente elevadas de recombinação separados por trechos de recombinação diminuída. Parece provável, por exemplo, que a maior taxa de recombinação vista em mulheres *versus* homens é um reflexo do estado mais condensado dos cromossomos do sexo masculino.

Múltiplas mutações estão presentes na maior parte dos tumores humanos, e estas modificações genéticas parecem ser necessário para produzir e seleccionar células pré-malignas, malignas, e metastáticas. Desestabilização de genes no câncer podem ser explicado pelos *hot spots* pré-existentes ou pela criação de *hot spots* novos através do rearranjo deles próprios.

Esse é o primeiro estudo que inclui uma análise de SNPs no interior do gene *FLI1* em pacientes afetados pelo sarcoma de Ewing em população brasileira. Aqui, foram analisados SNPs localizados dentro da região de quebra do gene *FLI1*. Comparamos as frequências alélicas e genotípicas entre as populações deste estudo e entre populações de projetos já publicados no *National Centre for Biotechnology Information* (NCBI). Através dessas comparações foi possível notar as diferenças e/ou similaridades entre as populações e isso mostrou como é importante conhecer as frequências da nossa população. Procuramos também analisar se algum SNP ou se alguma combinação específica desses SNPs poderia influenciar na incidência ou na herança preferencial do Sarcoma de Ewing. Nossos resultados mostraram uma maior incidência no genótipo AA-rs497714 nos pacientes, o que demonstra que este genótipo pode estar associado ao Sarcoma de Ewing e que este polimorfismo possa

provavelmente ser um marcador genético em potencial para esta doença ou que possa ser um fator importante no entendimento da quebra cromossômica que ocorre no gene *FLI1*.

A fusão entre os genes *FLI1* e *EWS* é um evento oncogênico-chave no tumor de Ewing, por originar um fator de transcrição quimérico aberrante. Nesse sentido, a região carboxi-terminal de *FLI1* é uma fonte rica de informações para estudos de susceptibilidade. Na perspectiva para ampliar o presente trabalho foram já identificados outros três SNPs na mesma região de quebra do gene *FLI1*, igualmente importantes, os quais em conjunto com os já estudados, enriquecerão as informações aqui enfocadas.

Pouco se sabe sobre o Sarcoma de Ewing e o seu desenvolvimento, sendo então importante a investigação dos diferentes genes associados a esta doença. Para ampliar este estudo, também estão sendo analisados SNPs no gene *EWS*, o qual faz parte da translocação junto com o gene *FLI1*, assim como análises de regiões repetitivas (GGAA) no gene *NROB1*, onde se liga o produto quimérico *EWS/FLI1*. A proliferação celular em um indivíduo afetado pode ocorrer não apenas pelo padrão de herança presente em um gene e sim devido a um efeito cumulativo de diferentes fatores em diferentes genes. Dessa maneira, a alteração celular se estabelece e inicia-se a proliferação. Isso significa que para conhecer a susceptibilidade de um indivíduo a um câncer como o Sarcoma de Ewing, não basta apenas conhecer padrões presentes no gene *FLI1*, mas também se devem estudar as estruturas gênicas presentes em, pelo menos, outros genes como *NBOR1* e *EWS*.

É possível que a análise conjunta de todos os estudos envolvendo o Sarcoma de Ewing possa ajudar a melhor compreender este câncer e os mecanismos que levam a sua formação e o seu desenvolvimento. O câncer sofre a interferência de múltiplos fatores. Diversos fatores externos e fatores intrínsecos podem determinar simultaneamente a susceptibilidade de um indivíduo a essa doença complexa. Cada efeito externo e cada um dos genes herdados exercerão isoladamente um pequeno efeito, mas que cumulativamente definirá o desfecho da proliferação celular. O descontrole celular que leva ao tumor está, portanto, muito relacionado à herança genética que o indivíduo recebeu. Recentemente tem sido relacionada à presença de padrões no promotor do gene *FLI1* a uma resposta anormal celular. Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram uma maior frequência do genótipo AA-rs497714 em pacientes com sarcoma de Ewing. Considerando que a literatura experimental tem reportado que variantes no *FLI1* podem levar ao desenvolvimento de hipoplasia, é possível sustentar a possibilidade de que determinadas estruturas nesse gene possam influenciar o risco de um indivíduo. Apesar destes resultados, acredita-se estar longe da obtenção de uma resposta concreta sobre quais os reais fatores que desencadeiam a susceptibilidade ao sarcoma. Há ainda muito que se descobrir sobre o câncer e de como o organismo humano responde aos diferentes fatores intrínsecos e extrínsecos, e por que algumas pessoas tendem a ter o mesmo desfecho clínico, mesmo não sendo encontrada associação estatística com os principais sinalizadores do câncer. Trabalhar com esta variante polimórfica do gene *FLI1* foi um empenho

a mais na busca de desvendar parte do pequeno efeito que a herança genética pode ter sobre a tumorigênese.

Com base nos objetivos deste trabalho, as conclusões foram que:

1- Entre os SNPs presentes no gene *FLI1* mais informativos, segundo a frequência dos alelos nas populações e o seu efeito fenotípico, estão rs640098, rs497714 e rs611307.

2- Foi gerada e estabelecida com êxito a genotipagem dos SNPs selecionados e executada nas amostras de DNA provenientes de pacientes afetados pelo Sarcoma de Ewing, nos indivíduos aparentados ao afetado (pai, mãe e irmãos), bem como em amostras de DNA proveniente de indivíduos não afetados pelo Sarcoma de Ewing (população controle).

3- As frequências genotípicas e alélicas dos SNPs do gene *FLI1* no grupo de afetados e na população controle estiveram dentro do equilíbrio de Hardy-Weinberg e foram: Controle – rs640098: AA=12.7; AG=48.8; GG=38.5; A=37.1; G=62.9, rs497714: AA=14.9; AC=48.7; CC=36.3; A=39.3; C=60.7, rs611307: CC=43.6; CT=45.5; TT=10.9; C=66.3; T=33.7. Afetados - rs640098: AA=16.7; AG=50.0; GG=33.3; A=41.7; G=58.3, rs497714: AA=37.5; AC=25.0; CC=37.5; A=50.0; C=50.0, rs611307: CC=37.5; CT=45.8; TT=16.7; C=60.4; T=39.6.

4- Ao comparar as frequências genotípicas, alélicas e haplotípicas entre os grupos de indivíduos afetados e controles foi verificado que apenas uma diferença foi estatisticamente significativa: o genótipo AA-rs497714 mostrou-se com maior incidência entre os pacientes.

5- A análise de segregação de alelos e haplótipos entre geração parental e filial afetada mostrou ausência de desequilíbrio de transmissão entre as gerações.

ANEXO - CEP-PUCRS



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

OF.CEP-570/11

Porto Alegre, 08 de abril de 2011.

Senhora Pesquisadora,

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 11/05422 intitulado **"Haplótipos de diferentes SNPs no interior do gene FLI1 em indivíduos afetados e não-afetados pelo sarcoma de Ewing"**.

Salientamos que seu estudo pode ser iniciado a partir desta data.

Os relatórios parciais e final deverão ser encaminhados a este CEP.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Rodolfo Herberto Schneider
Coordenador do CEP-PUCRS

Ilma. Sra.
Profa. Clarice Sampaio Alho
FABIO
Nesta Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 - 3º andar - CEP: 90610-000
Sala 314 - Fone Fax: (51) 3320-3345
E-mail: cep@pucrs.br
www.pucrs.br/prppg/cep

ANEXO – SUBMISSÃO ARTIGO

Detailed Status Information

Manuscript #	JHG-12-170
Current Revision #	0
Submission Date	3rd Apr 12 17:30:02
Current Stage	With Editorial Office
Title	EWING'S SARCOMA: ANALYSIS OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM IN THE FLI1 GENE
Running Head	SNPs and Ewing's Sarcoma.
Manuscript Type	Original Article
Corresponding Author	Dr. Clarice Alho (csalho@pucrs.br) (PUCRS)
Contributing Authors	Miss Fernanda Rosa Sawitzki , Miss Déborah Soares Bispo Santos Silva , Miss Elisa De Toni , Miss Pietra Graebin , Ms. Juliane Picanço , Dr. Ana Lucia Abujamra , Miss Caroline Farias , Dr. Rafael Roesler , Dr. Algemir Brunetto
Abstract	In this study the SNPs rs640098, rs491714, rs611307 into the FLI1 gene were genotyped in a sample of 201 subjects from southern Brazilian population, in 24 Ewing's sarcoma patients (geographically matched with control group) and 54 of their family members. We performed association studies comparing genotypic frequencies of these SNPs into the FLI1 gene, and all possible genotype combinations between Ewing's Sarcoma patients and control group. Of the three SNPs investigated individually, only one showed a significant result when compared to the control group; our non-combined analysis revealed a significantly higher presence of homozygote A-rs497714 among Ewing's Sarcoma patients ($p=0.0065$; Chi square Test). In all other tested clusters, we noticed a higher rate of homozygote A-rs497714 among Ewing's Sarcoma patients independently of the other SNP-arrangements and/or haplotype combinations. We performed transmission disequilibrium tests comparing data from Ewing's Sarcoma patients and from their families (parents and siblings), but no statistically significant result was found. In conclusion, the present study provides evidence statistically founded that the AA-rs497714 FLI1 genotype can associated with Ewing's sarcoma, this polymorphism can be clinically useful as a potential genetic marker to the prognostic of risk to develop this cancer or to provide insights into FLI1 chromosome breakage context of tumorigenesis.
Keywords	SNP, Ewing's sarcoma, rs640098, rs497714, rs611307

Stage	Start Date
Under Review	3rd Apr 12 17:30:02
Author Approved Converted Files	3rd Apr 12 17:30:02
Preliminary Manuscript Data Submitted	3rd Apr 12 16:22:03