

Разработка метода обнаружения однонуклеотидной замены в некодирующем локусе ДНК rs17185536: потенциальное диагностическое значение

А. С. Горбенко, биолог¹

М. А. Столяр, биолог¹, лаборант²

Ю. Ю. Комаровский, биолог¹

М. А. Михалев, врач-гематолог¹, н.с.³

В. В. Потылицина, к.м.н., врач клинической лабораторной диагностики⁴

Е. В. Васильев, врач-гематолог⁵

И. А. Ольховский, с.н.с.², директор¹

¹Красноярский филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России, г. Красноярск

²ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр“» Сибирского отделения РАН, г. Красноярск

³КГБУЗ «Красноярская межрайонная клиническая больница № 7», г. Красноярск

⁴КГБУЗ «Красноярский краевой клинический центр охраны материнства и детства», г. Красноярск

⁵КГБУЗ «Краевая клиническая больница», г. Красноярск

Design of method for detecting single nucleotide polymorphisms of DNA non-coding region rs17185536: potential diagnostic value

A. S. Gorbenko, M. A. Stolyar, Yu. Yu. Komarovskiy, M. A. Mikhalev, V. V. Potylitsyna, E. V. Vasilyev, I. A. Olkhovskiy

Krasnoyarsk branch of the National Medical Research Center for Hematology, Federal Research Centre 'Krasnoyarsk Scientific Centre', Krasnoyarsk Interdistrict Clinical Hospital No. 7, Krasnoyarsk Regional Clinical Center for Maternal and Child Health, Regional Clinical Hospital; Krasnoyarsk, Russia

Резюме

Проведенное в 2018 году широкомасштабное исследование баз данных секвенирования ДНК (Jorgenson E., et al.) для поиска наследственной предрасположенности к ранней эректильной дисфункции выявило ассоциацию с однонуклеотидной заменой rs17185536-T, регулирующей экспрессию топографически близких генов, среди которых находится ген SIM1, играющий важную роль в поддержании массы тела и сексуальной функции. Близость локуса rs17185536 к генам CCNC (циклин C), PRDM13 (метилтрансфераза гистонов) и USP45 (убиквитин-специфическая пептидаза 45) предполагает возможное участие данного полиморфизма в патогенезе и других заболеваний, связанных с нарушениями функции продуктов данных генов. Цель работы заключалась в разработке методики определения локуса ДНК rs17185536 и проверке предположения о его связи с риском развития патологии беременности и плода, а также с прогнозом развития хронических миелопролиферативных заболеваний. Материалы и методы. В исследовании были включены 280 человек, 81 из которых здоровые доноры, 116 беременных женщин, 25 пациентов с истинной полицитемией, 29 с эссенциальной тромбоцитемией и 29 с первичным миелофиброзом. Результаты. С использованием оригинальной методики определения rs17185536 аллель-специфической ПЦР-РВ показано, что распространенность аллеля T среди всех обследованных групп составила 16%, и варианты генотипов составили: C/C — 73%, C/T — 23% и T/T — 4%, что соответствует данным Jorgenson et al. Отсутствие статистически значимых различий частоты встречаемости данного полиморфизма хронических миелопролиферативных заболеваний свидетельствует о низкой вероятности вовлечения rs17185536-T в патогенез данных заболеваний. В группе беременных женщин показана ассоциация аллеля rs17185536-T с ожирением, миомой матки и развитием преэклампсии. Выводы. Впервые с использованием оригинальной методики анализа проведена оценка распространенности гена наследственной предрасположенности к импотенции. Несмотря на топографическую близость локуса rs17185536 к генам регуляции репарации и функционирования ДНК, его полиморфизмы не оказывают влияния на риск развития хронических миелопролиферативных заболеваний. Обнаруженная ассоциация аллеля rs17185536-T с риском развития патологии беременности требует дополнительного изучения.

Ключевые слова: однонуклеотидный полиморфизм ДНК, rs17185536, LOC 728012, хронические Ph-негативные миелопролиферативные новообразования, патология беременности.

Summary

A large-scale study of DNA sequencing databases (Jorgenson E., et al., 2018) to search for hereditary susceptibility to early erectile dysfunction revealed an association with the rs17185536-T polymorphism regulating the expression of topologically associating domain, among which is the SIM1 gene, which plays an important role in maintaining mass body and sexual function. The proximity of the rs17185536 locus to the CCNC (cyclin C), PRDM13 (histone methyltransferase) and USP45 (ubiquitin-specific peptidase 45) genes suggests the possible involvement of this polymorphism in the pathogenesis and other diseases associated with impairments of these genes. Materials and methods. The study included a total of 280 people: 81 of which were healthy donors, 116 pregnant women, 25 patients with polycythemia vera, 29 with essential thrombocythemia, and 29 with primary myelofibrosis. Results. Using the original method of determining the polymorphism rs17185536, the allele of specific PCR-RT showed that the prevalence of the T allele among all examined patients was 19%, and variants of the genotypes: C/C with 73%, C/T with 23% and T/T with 4%, which corresponds to Winkler et al. data. The absence of statistically significant differences in the frequency of occurrence of this polymorphism in the pathology of pregnancy and in chronic myeloproliferative diseases indicates a low probability of involvement of rs17185536-T in the pathogenesis of these diseases. In the group of pregnant women, there is an association of the rs17185536-T allele with obesity, uterine fibroids and the development of preeclampsia. Conclusions. For the first time, using the original method of analysis, it was confirmed that the Russian population has a comparable prevalence of the gene of hereditary susceptibility to impotence. Despite the topographic proximity of the rs17185536 locus to the genes regulating the repair and functioning of DNA, its polymorphisms do not affect the risk of chronic myeloproliferative diseases developing. The association of the rs17185536-T allele with the risk of developing a pregnancy pathology requires further study.

Key words: single nucleotide DNA polymorphism, rs17185536, LOC 728012, chronic Ph-negative myeloproliferative neoplasms, pregnancy pathology.

Введение

Результаты исследований последовательности ДНК в рамках широко проводимого изучения связи отдельных генетических и фенотипических особенностей Genome-Wide Association Studies (GWAS) позволяют выявлять перспективные точки приложения для новых персонализированных подходов к профилактике и терапии заболеваний. Среди таких выявляемых генетических детерминант часто встречаются участки нетранслируемой ДНК, не кодирующие никаких известных функциональных белков. Одним из таких генетических локусов является участок ДНК на шестой хромосоме 6q16 LOC 728012, имеющий два варианта однонуклеотидного полиморфизма rs17185536 (Т/С). Ранее была показана ассоциация данного полиморфизма с индексом «талия / бедра» [1], уровнем свободного тироксина в крови [2], нормализацией артериального давления в процессе немедикаментозной терапии гипертензии [3], а также вовлечение в регуляцию иммунного ответа [4].

Однако наибольшую известность полиморфизм rs17185536-Т получил после недавней публикации [5], продемонстрировавшей его связь с развитием ранней эректильной дисфункции. Авторы объясняют выявленный феномен вовлечением rs17185536 в регуляцию экспрессии расположенного рядом гена *SIM1*. Ген *SIM1* — сокращенное название от single-minded family basic helix-loop-helix transcription factor 1, является частью системы «лептин — меланокортин», которая имеет важную роль в поддержании массы тела и регуляции сексуальной функции. Вместе с тем, кроме гена *SIM1*, в топологически ассоциирующей области с rs17185536 находятся также гены *MCHR2* (рецептора меланин-концентрирующего гормона второго типа), *CCNC* (циклин С), *PRDM13* (метилтрансфераза гистонов) и *USP45* (убиквитин-специфическая пептидаза 45, которая важна для репарации двойных разрывов ДНК с участием XPF-ERCC 1). Учитывая ассоциацию экспрессии этих генов, а также микроделетий и транслокаций 6q16 с патологией развития плода [6] и рядом онкологических заболеваний [7], можно было предположить, что исследование полиморфизма rs17185536 будет полезным в оценке риска бесплодия, патологии беременности, а также для прогноза развития онкогематологических заболеваний. До сих пор ассоциация rs17185536 с патологией беременности и отдельными вариантами хронических миелопролиферативных

заболеваний (ХМПЗ) не исследовалась. Вместе с тем в доступной литературе мы не нашли описания метода детекции данного полиморфизма, не связанного с необходимостью секвенирования ДНК.

Целью настоящей работы являлись разработка методики для выявления однонуклеотидной замены в rs17185536 и оценка распространенности его аллельных вариантов у беременных и пациентов с хроническими миелопролиферативными заболеваниями.

Материалы и методы

Клинические образцы. В исследование включены анонимные пробы крови 25 пациентов с истинной полицитемией (ИП) в возрасте от 29 до 73 лет (14 женщин и 11 мужчин), 29 пациентов с эссенциальной тромбоцитемией (ЭТ) в возрасте от 36 до 77 лет (20 женщин и 9 мужчин), 29 пациентов с развившимся на момент обследования миелофиброзом (МФ) в возрасте от 42 до 83 лет (15 женщин и 14 мужчин), а также анонимные пробы 81 здорового донора крови в возрасте от 20 до 68 лет (57 женщин и 24 мужчины), составляющих группу контроля. Кроме того, в исследование были включены 116 проб крови женщин от 19 до 37 лет с различными вариантами патологически протекающей беременности: с миомой матки — 28, с ожирением II-III ст. — 18 и с развившейся во время беременности преэклампсией — 13). Поскольку исследование имело исключительно эпидемиологический характер, сбор персонализированной информации не проводился.

Выделение ДНК. Выделяли ДНК из лейкоцитов крови с использованием комплекта реагентов «ДНК-сорб-В» (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии», Россия).

Дизайн праймеров. Используя систему подбора праймеров WASP [8], был разработан набор с оригинальными праймерами для выявления данного полиморфизма с помощью реакции ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Праймеры для ПЦР-РВ были следующими: прямой праймер на аллель «дикого» типа 5'-ATGAACCTTCAATTACC ATACAATC-3'; прямой праймер на аллель «мутантного» типа 5'-ATGAACCTTCAATTACCATACAATT-3'; общий обратный праймер 5'-TTCAAATGTTGTTCAAAGCA-3'. Детекцию продукта реакции осуществляли с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I.

Таблица 1
Значения пороговых циклов, полученных в результате проведения ПЦР-РВ в градиенте температур

Температура отжига, °C	Проба № 1, генотип С/С		Проба № 2, генотип С/Т		Проба № 3, генотип Т/Т	
	Аллель С	Аллель Т	Аллель С	Аллель Т	Аллель С	Аллель Т
65,0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
64,5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
63,3	30,7	N/A	28,5	N/A	N/A	34,6
61,4	21,1	N/A	21,6	23,4	N/A	24,7
59,0	19,0	31,8	20,7	20,5	N/A	22,0
57,0	18,6	30,2	20,5	20,5	N/A	20,8
55,7	18,7	29,7	20,4	20,5	N/A	21,8
55,0	18,6	29,4	20,5	20,4	N/A	22,6

Примечание: N/A — отсутствие флуоресцентного сигнала.

Проведение ПЦР. Для проведения реакции амплификации использовался амплификатор Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad Laboratories, США). Условия амплификации были следующие: 95 °С в течение 5 мин., 40 циклов при температуре 95 °С в течение 15 с и 57 °С в течение 60 с.

Статистическую обработку полученных данных распространности генетических полиморфизмов проводили с использованием web-калькулятора на сайте gen-exr.ru.

Результаты

Для оптимизации режима отжига праймеров провели постановку ПЦР-РВ проб с заранее известными генотипами при градиенте температур в диапазоне 55–65 °С. В ходе эксперимента установлено, что оптимальная температура отжига праймеров составляет 57 °С. Результаты представлены в табл. 1. Величина порогового цикла больше 30 свидетельствует об отсутствии в пробе искомого аллеля. В пробе с генотипом С/С при температуре 57 °С наблюдался наиболее ранний пороговый цикл для аллеля С, при этом для аллеля Т он был больше 30. В гетерозиготной пробе с генотипом С/Т наблюдались одинаковые значения пороговых циклов для аллелей С и Т при температуре 57 °С. В пробе с генотипом Т/Т наблюдались отсутствие сигнала от аллеля «дикого» типа и наиболее ранний пороговый цикл для «мутантного» аллеля, что является оптимальным при исследовании однонуклеотидных полиморфизмов.

На рисунке представлен пример детекции отдельных замен rs17185536 с использованием разработанного метода, результаты хорошо воспроизводятся в дублированных постановках.

В табл. 2 приведены результаты выявления однонуклеотидного полиморфизма rs17185536 среди обследованных групп пациентов. В целом по всем обследованным лицам частоты распределения соответствуют закону Харди-Вайнберга. Было выявлено, что в целом по всем обследованным группам частота встречаемости мутантного аллеля Т составила 16%. Значимых различий в распределении аллельных полиморфизмов в выбранных группах пациентов с ХМН обнаружено не было ($p > 0,05$).

Вместе с тем результаты тестирования в выделенной группе беременных женщин с повышенным риском развития патологии продемонстрировали существенное различие в распределении аллелей rs17185536 (табл. 3). Аллель С детектировалась в 2,6 раза чаще у беременных без патологии, а аллель Т в 1,7 чаще в группе риска в сравнении с контролем. При сравнении беременных без патологии и группы риска отношение шансов ассоциации аллеля Т составило более 4,3 ($P < 0,01$).

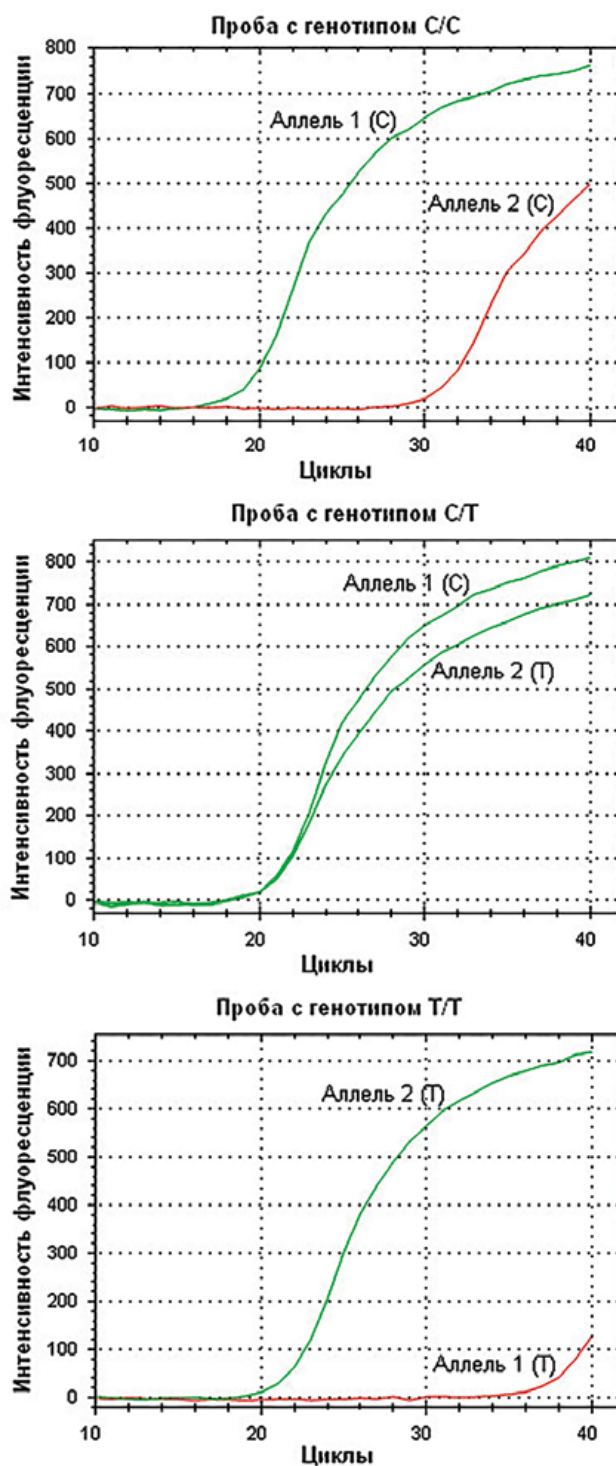


Рисунок. Пример детекции разных вариантов генотипов rs17185536.

Таблица 2
Частота встречаемости однонуклеотидного полиморфизма rs17185536 среди обследованных групп пациентов

Генотип	Группа контроля Количество, абс. (%)	ИП Количество, абс. (%)	ЭТ Количество, абс. (%)	МФ Количество, абс. (%)	Все ХМПЗ
Всего проб	81	25	29	29	83
С/С	53 (65%)	16 (64%)	21 (73%)	24 (83%)	61 (73%)
С/Т	25 (31%)	7 (28%)	7 (24%)	5 (17%)	19 (23%)
Т/Т	3 (4%)	2 (8%)	1 (3%)	0	3 (4%)
Аллель С	131 (81%)	39 (78%)	49 (85%)	53 (91%)	141 (85%)
Аллель Т	31 (18%)	11 (22%)	9 (15%)	5 (9%)	25 (15%)

Таблица 3
Распределение аллельных вариантов rs17185536 у беременных; количество абс., (%)

Генотип	Беременные без патологий; кол-во абс., (%) -1-		Беременные объединенной группы патологии; кол-во абс., (%) -2-	
Всего проб	41		59	
Аллель С	76 (93%)		88 (75%)	
Аллель Т	6 (7%)		30 (25%)	
Отношение шансов (с группой контроля)	Аллель С 2,61 (1,08–6,28)		Аллель Т 0,38 (0,16–0,92)	
Р	0,03		Аллель С 0,6 (0,36–1,0)	
Отношение шансов (между группами 1 и 2)	Аллель Т 0,23 (0,09–0,59)		Аллель Т 1,66 (1,00–2,74)	
Р	0,001		0,05	

Обсуждение

Основанием для проведения настоящей работы послужили данные о роли полиморфизма некодирующего участка ДНК rs17185536 в регуляции экспрессии топографически ассоциированных генов *SIM-1*, *MCHR 2*, *CCNC*, *PRDM13* и *USP45*. Продукт гена *SIM1* участвует в регуляции меланокортинового пути, который отвечает как за пищевое, так и половое поведение млекопитающих, в то время как гены циклина С, метилтрансфераза гистонов и убиквитин-специфической пептидазы известны своим участием в регуляции репарации ДНК и клеточного цикла. Последнее давало повод для исследования возможной роли rs17185536 как фактора риска развития патологии беременности и (или) онкогематологических заболеваний.

Полученные в нашей работе данные о распространенности аллеля Т полиморфизма rs17185536 среди всех обследованных пациентов г. Красноярска соответствуют данным о распространенности данного полиморфизма в международном исследовании [5]. Отсутствие статистически значимых различий частоты встречаемости данного полиморфизма при хронических миелопролиферативных заболеваниях свидетельствует о низкой вероятности вовлечения rs17185536-Т в патогенез выбранных нами заболеваний. В группе беременных женщин показана ассоциация аллеля rs17185536-Т с ожирением, миомой матки и развитием преэклампсии.

Вместе с тем мы подтвердили наличие в российской популяции сопоставимой распространенности гена наследственной предрасположенности к импотенции. Информацию о носительстве полиморфизма риска ранней эректильной дисфункции важно учитывать в диагностике сексуальных расстройств, также при назначении лекарственных препаратов с высоким риском побочного влияния на данную функцию. Дальнейшее исследование функции гена *SIM1* будет способствовать разработке персонализированных препаратов для профилактики и лечения импотенции.

Заключение

В результате настоящей работы разработан набор реагентов для определения полиморфизма rs17185536 гена *SIM1* с применением метода ПЦР-РВ и определена распространенность данного полиморфизма у жителей г. Красноярска. Было установлено, что в целом по всем группам обследованных пациентов распределение частот встречаемости аллельных вариантов полиморфизма rs17185536 не отличается от распространенности, определенной в международных исследованиях. Впервые показана ассоциация rs17185536-Т с наличием миомы матки, ожирением II–III степени и развитием преэклампсии у беременных. Полученные данные требуют дополнительного подтверждения на более обширной выборке.

Источник финансирования: ООО «Формула гена» (www.formulagena.ru). В работе было использовано оборудование: ФИЦ КНС СО РАН Сибирского федерального университета.

Авторы подтверждают, что статья или ее части ранее не были опубликованы.

Список литературы

- Winkler TW, Justice AE, Graff M, et al. The Influence of Age and Sex on Genetic Associations with Adult Body Size and Shape: A Large-Scale Genome-Wide Interaction Study. // *PLoS Genet.* — 2015. — Vol. 11, N 10. — e1005378. DOI: 10.1371/journal.pgen.1005378.
- Teumer A, Chaker L, Groeneweg S, et al. Genome-wide analyses identify a role for SLC17A4 and AADAT in thyroid hormone regulation. // *Nat Commun.* — 2018. — Vol. 9, N 1. — P. 4455.
- Bhasin, Manoj K., John W. et al. Specific Transcriptome Changes Associated With Blood Pressure Reduction In Hypertensive Patients After Relaxation Response Training. // *The Journal Of Alternative And Complementary Medicine.* — Vol. 24, N 5. P. 486–504.
- Ceppi M, Clavarino G, Gatti E et al. Ribosomal protein mRNAs are translationally-regulated during human dendritic cells activation by LPS. // *Immunome Res.* — 2009. Vol. 5, N 1. — P. 5.
- Jorgenson E, Matharu N, Palmer MR, et al. Genetic variation in the SIM1 locus is associated with erectile dysfunction. // *Proc Natl Acad Sci USA.* — 2018. — Vol. 115, N 43. — P. 11018–11023.
- El Khattabi L, Guimiot F, Pipiras E, et al. Incomplete penetrance and phenotypic variability of 6q16 deletions including SIM1. // *Eur J Hum Genet.* — 2014. — Vol. 23, N 8. — P. 1010–8.
- Chromosome 6. atlasgeneticsoncology.org. Published 2019. Последнее обращение 13.02.2019.
- WASP. [bioinfo.biotech.or.th/WASP/](http://bioinfo.biotech.or.th/bioinfo.biotech.or.th/WASP/). Published 2019. Последнее обращение 13.02.2019.

Для цитирования. Горбенко А. С., Столяр М. А., Комаровский Ю. Ю., Михалев М. А., Потылицина В. В., Васильев Е. В., Ольховский И. А. Разработка метода обнаружения однонуклеотидной замены в некодирующем локусе ДНК rs17185536: потенциальное диагностическое значение // *Медицинский алфавит. Серия «Современная лаборатория».* — 2019 — Т. 3. — 22(397). — С. 11–14.

