

На правах рукописи



БРОВКИНА ОЛЬГА ИГОРЕВНА

**ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИИ ГЕНОВ-КАНДИДАТОВ С
САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 1 ТИПА И ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ТЕСТ-
СИСТЕМА ДЛЯ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ РИСКА РАЗВИТИЯ
САХАРНОГО ДИАБЕТА 1 ТИПА**

03.01.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2012

Работа выполнена в лаборатории молекулярной диагностики и геномной дактилоскопии ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» (ФГУП «ГосНИИ генетика»)

Научный руководитель:

Доктор биологических наук, профессор,
ФГУП «ГосНИИ генетика», г. Москва

Носиков Валерий Вячеславович

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук, профессор,
ФГУБН «Институт биохимии
им. А.Н. Баха» РАН, г. Москва

Вейко Владимир Петрович

Доктор биологических наук,
ФГУБН «Институт молекулярной
генетики» РАН, г. Москва

Шадрина Мария Игоревна

Ведущая организация:

ФГБУ «Медико-генетический
научный центр» РАМН

Защита состоится «22» января 2013 г. в 14 часов на заседании Диссертационного совета Д.217.013.01 при Государственном научно-исследовательском институте генетики и селекции промышленных микроорганизмов по адресу: 117545, Москва, 1-й Дорожный проезд, 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУП «ГосНИИ генетика».

Реферат разослан «21» декабря 2012 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
кандидат химических наук



Т. Л. Воюшина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Сахарный диабет (СД) типа 1 является одним из наиболее распространенных и тяжелых наследственных заболеваний человека. Как правило, при наличии генетической предрасположенности он развивается в раннем возрасте и вызывает тяжелые осложнения, такие как поражения кровеносных сосудов, почечную недостаточность, слепоту, гангрены.

Лечение уже развившегося СД типа 1 со сформировавшимся фенотипом требует огромных материальных ресурсов. С другой стороны, при своевременной профилактике заболевания у пациентов с повышенным генетическим риском можно, как минимум, значительно отсрочить появление симптомов сахарного диабета и снизить опасность развития осложнений. Поэтому в настоящее время одним из наиболее прогрессивных подходов является разработка стратегии ранней диагностики, прогнозирования и превентивной терапии заболевания с использованием генетических маркеров.

Наследование СД типа 1 имеет полигенный характер. Генетическая предрасположенность к СД типа 1 связана с наследованием определенных аллелей обычных “здоровых” генов. Иногда эти аллели, которые определяют предрасположенность к СД типа 1 и сцеплены с заболеванием, называют этиологическими мутациями или вариантами. Часто этиологические варианты широко распространены в популяции, но при этом каждый из них сам по себе не приводит к развитию заболевания.

Только наличие определенной комбинации этиологических вариантов в генах, предрасполагающих к заболеванию, может приводить к физиологическим нарушениям, находящим свое выражение в развитии СД типа 1. Частоты встречаемости этих вариантов в разных этнических группах существенно различаются, соответственно различается и популяционный риск, связанный с каждым из них. Поэтому первоочередной задачей исследователей в области генетики СД типа 1 является поиск генов и полиморфных маркеров, предрасполагающих к заболеванию, в конкретных этнических группах.

В настоящее время для ранней диагностики в лечебных центрах России используется главным образом один хромосомный локус - это локус *MHC* (главный комплекс гистосовместимости).

Целью работы было изучение ассоциации полиморфных маркеров ряда генов-кандидатов с развитием СД типа 1 и разработка диагностической тест-системы для ранней диагностики риска развития СД типа 1.

Для достижения этой цели ставились следующие задачи:

1. Определить частоты аллелей и генотипов полиморфных маркеров *rs41295061* и *rs11594656* гена *IL2RA*, кодирующего α -цепь рецептора интерлейкина 2, полиморфного маркера *rs2069762* гена *IL2*, кодирующего интерлейкин 2, полиморфного маркера *rs333* гена *CCR5*, кодирующего рецептор хемокинов типа 5, полиморфного маркера *rs3087243* гена *CTLA4*, кодирующего антиген 4 цитотоксических Т-лимфоцитов, и полиморфного маркера *rs10509540* гена *RNLS*, кодирующего реналазу.
2. Сформировать систему полиморфных маркеров, определяющих до 90 – 95% генетического риска развития СД типа 1 в русской популяции.
3. Выбрать наиболее чувствительный и эффективный молекулярно-генетический подход для ранней диагностики риска развития СД типа 1.
4. Разработать новый перспективный метод и создать опытный образец диагностической тест-системы для диагностики риска развития СД типа 1.

Научная новизна и практическая значимость работы

Результаты, представленные в диссертационной работе, являются значимыми для русской популяции, так как выявляют важные отличия в механизмах развития СД типа 1 между представителями русской и ряда других европейских популяций.

На данный момент в РФ не существует разработанных универсальных подходов к созданию диагностических тест-систем для молекулярно-генетической диагностики соматических заболеваний.

В отечественной и зарубежных патентных базах данных отсутствуют какие-либо сведения о разработке и способах применения диагностических методов для молекулярной диагностики СД типа 1 по генотипам предрасполагающих генов. Поэтому результаты данной работы являются значимыми для практической работы врача-эндокринолога.

Апробация работы. Диссертационная работа была представлена на заседании Секции молекулярной биологии Ученого совета ФГУП “ГосНИИ генетика” от 23 октября 2012 г. Результаты настоящей работы докладывались на 10-ой международной конференции для молодых ученых “Биохимическая физика” (2010 г.), на 4-ой международной конференции для молодых ученых “*Molecular biology: advances and perspectives*”(2011 г.), на Всероссийском конгрессе эндокринологов (2012 г.) и на конференции для молодых ученых “*Ломоносов 2012*” (2012 г.).

Публикации. По материалам работы опубликовано 7 печатных работ, включая 2 статьи, а также тезисы докладов и сообщений на международных конференциях.

Структура диссертации. Диссертация состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, описание использованных материалов и методов, результаты и их обсуждение, выводы и список литературы. Материалы диссертации изложены на 94 страницах машинописного текста и содержат 17 таблиц и 17 рисунков.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Формирование групп больных, материалы и методы.

В работе использовали образцы крови от двух групп больных СД типа 1 (366 человек) и здоровых индивидов (526 человек) русского происхождения, любезно предоставленных сотрудниками Эндокринологического научного центра РАМН (г. Москва). Характеристика обследованных групп пациентов и здоровых индивидов представлены в табл.1.

Характеристики обследованных групп больных СД типа 1 (группа «СД1+») и здоровых индивидов (группа «СД1-»)

Показатель	Группа «СД1+»	Группа «СД1-»
Пол (М/Ж)	198/168	300/226
Возраст, лет*	14,5 ± 6,5	39,2 ± 14,8
Возраст начала СД, лет*	6,3 ± 4,3	–
Гликированный гемоглобин HbA _{1c} , %*	6,9 ± 1,5	4,9 ± 0,9

*S.D. – стандартное отклонение

Геномную ДНК пациентов использовали для амплификации фрагментов ДНК, содержащих полиморфные участки ряда генов-кандидатов, предположительно вовлеченных в патогенез СД типа 1. Определение аллелей и генотипов изучаемых генов проводилось с помощью амплификации «в реальном времени».

Анализ нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью системы NCBI в сети Интернет (www.ncbi.nlm.nih.gov). Использовали следующие разделы: MapView (построение генетической карты), dbSNP (информация о полиморфных маркерах). Для подбора праймеров использовали пакет программ Invitrogen Vector NTI Advance 10 (версия Education). Для анализа блоков неравновесия по сцеплению и выбора полиморфных маркеров, характеризующих максимальное количество однонуклеотидных полиморфизмов в данной хромосомной области, использовалась программа HaploView версии 3.2.

Для сравнения частот аллелей и генотипов исследуемых полиморфных маркеров в группах с наличием и отсутствием заболевания нами использовался критерий χ^2 . Значимыми считали различия при $p < 0,05$. В нашей работе распределение частот генотипов всех полиморфных маркеров исследуемых генов в группе здоровых индивидов соответствовало распределению Харди-Вайнберга, существенных отличий от частот аллелей и генотипов в

европейских популяциях обнаружено не было. Данные о частотах в европейской популяции взяты из проекта HarMap (<http://hapmap.org>).

2. Ассоциация полиморфных маркеров ряда генов с СД типа 1.

2.1. Подтверждение ассоциации полиморфных маркеров *rs2040410* и *rs7454108* локуса HLA с СД типа 1.

В ряде работ было установлено, что более 90% больных СД типа 1 в европейских популяциях являются носителями антигенов DR3 и DR4, в то время как в общей популяции их количество не превышает 54%. При этом количество гомозиготных носителей генотипов *DR3/3* и *DR4/4* составляет только 7 и 9%, в то время как количество гетерозиготных носителей (*DR3/4*) достигает 34%. Таким образом, у гетерозиготных носителей генотипов *DR3/4* риск развития СД типа 1 значительно выше, чем у гомозиготных носителей *DR3* и *DR4*. Максимальный риск развития СД типа 1 имеют носители генотипа *DRB1*0301-DQA1*0501-DQB1*0201/DRB1*04-DQA1*0301-DQB1*0302* (*DR3/4-DQ8*) локуса HLA.

Определение напрямую аллельных вариантов генов системы HLA трудоемко и достаточно дорого. Самым распространёнными методами HLA-типирования являются метод сиквенс-специфических праймеров при проведении ПЦР или гибридизация с мечеными олигонуклеотидными зондами после окончания ПЦР.

В ряде работ была исследована возможность предсказания аллелей генов системы HLA с помощью идентификации аллелей однонуклеотидных полиморфных маркеров, сцепленных с гаплотипами *DR3/4* и *DQ8*. Было показано, что полиморфные маркеры *rs2040410* и *rs7454108*, расположенные в локусе HLA, ассоциированы с аллелями *DRB1*0301* и *DQB1*0302*, что позволяет использовать данные генотипирования этих двух маркеров для идентификации гаплотипа *DR3/DR4-DQ8*. Данный метод применялся в европейских работах по быстрому скринингу населения. Полиморфные маркеры *rs2040410* и *rs7454108* расположены на коротком расстоянии от генов *DRB1* и *DQB1*, соответственно

(рис.1), и находятся с ними в неравновесии по сцеплению. Наличие быстрых и эффективных методов генотипирования этих полиморфных маркеров значительно удешевляет и ускоряет проведение анализа.

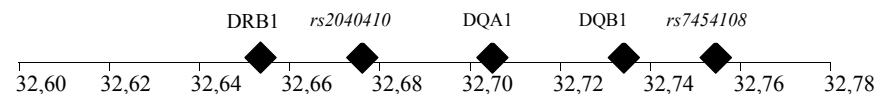


Рис. 1. Взаимное расположение полиморфных маркеров *rs2040410* и *rs7454108* и генов локуса HLA (расстояние в мегабазисах (Мб) от дистального конца хромосомы 6.

Подробная схема предложенного алгоритма представлена на рис. 2.

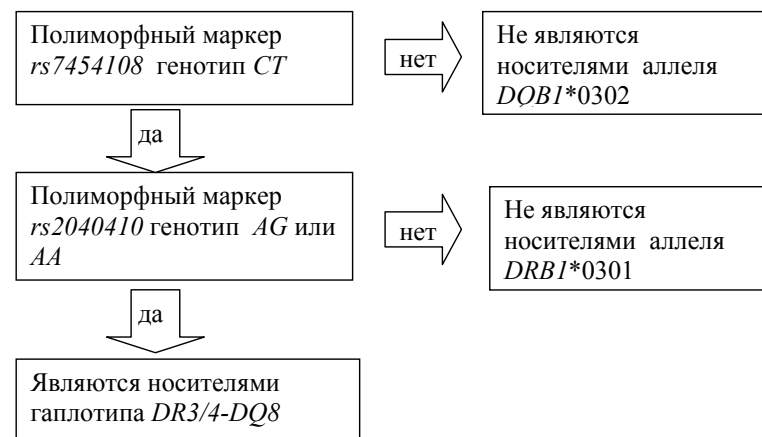


Рис. 2. Предлагаемый алгоритм для определения носителей гаплотипа *DR3/4-DQ8* с использованием полиморфных маркеров *rs2040410* и *rs7454108*.

Таким образом, носители генотипов *AG* и *AA* маркера *rs2040410* и генотипа *CT* маркера *rs7454108* являются носителями гаплотипа *DR3/4-DQ8*. В нашем исследовании мы получили данные, подтверждающие высоко достоверную ассоциацию с СД типа 1 полиморфных маркеров *rs2040410* и *rs7454108* среди русских больных и, следовательно, возможность их использования для быстрого определения риска развития СД типа 1 в нашей стране (табл. 2).

Таблица 2.

Сравнительный анализ распределения частот генотипов полиморфных маркеров *rs2040410* и *rs7454108* локуса HLA в группах “СД1+” и “СД1–”

Аллели и генотипы	Частоты генотипов		χ^2	<i>p</i>	OR [CI 95%]
	“СД1+” (n = 366)	“СД1–” (n = 526)			
<i>rs2040410 AG</i> и <i>rs7454108 CT</i>	0,426	0,060	191,57	< 10 ⁻¹⁵	11,49 [7,60–17,37]
<i>rs2040410 AA</i> и <i>rs7454108 CT</i>	0,106	0,066			1,68 [1,04–2,70]
<i>rs2040410 GG</i> и <i>rs7454108 CC/TT</i>	0,468	0,874			0,13 [0,09–0,18]

Легко видеть, что носители генотипов *AG* и *CT* полиморфных маркеров *rs2040410* и *rs7454108*, соответственно, имеют максимально высокий риск развития СД типа 1 (табл. 2). Таким образом, на основе данного метода с помощью двух полиморфных маркеров можно проводить индивидуальную оценку риска развития заболевания по локусу HLA. Кроме того, данный метод открывает возможности для проведения больших скрининговых программ, направленных на разработку методов профилактики СД типа 1.

2.2. Изучение ассоциации полиморфных маркеров *rs41295061* и *rs11594656* гена *IL2RA* и полиморфного маркера *rs2069762* гена *IL2* с СД типа 1.

Несмотря на то, что ключевые полиморфные маркеры *rs41295061* и *rs11594656* находятся между генами *IL2RA* и *RBM17*, развитие СД типа 1 связывают с геном *IL2RA*, исходя из функций его белкового продукта. Аллель *A* полиморфного маркера *rs41295061* (*A/C*) гена *IL2RA*, а следовательно и генотип *AA*, встречаются среди русских гораздо реже (табл. 3). В случае полиморфного маркера *rs11594656* (*A/T*) аллель *A* и генотип *AA* также достаточно редко встречаются среди русских (табл. 4).

Таблица 3.

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *rs41295061* гена *IL2RA* в группах “СД1+” и “СД1–”

Аллели и генотипы	Частоты аллелей и генотипов		χ^2	<i>p</i>
	“СД1+” (n = 366)	“СД1–” (n = 526)		
Аллель <i>A</i>	0,042	0,051	0,31	0,58
Аллель <i>C</i>	0,958	0,949		
Генотип <i>AA</i>	0,000	0,000	0,33	0,85
Генотип <i>AC</i>	0,085	0,102		
Генотип <i>CC</i>	0,915	0,898		

Таблица 4.

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *rs11594656* гена *IL2RA* в группах “СД1+” и “СД1–”

Аллели и генотипы	Частоты аллелей и генотипов		χ^2	<i>p</i>
	“СД1+” (n = 366)	“СД1–” (n = 526)		
Аллель <i>T</i>	0,782	0,767	0,26	0,61
Аллель <i>A</i>	0,218	0,233		
Генотип <i>TT</i>	0,605	0,578	0,29	0,87
Генотип <i>AT</i>	0,356	0,379		
Генотип <i>AA</i>	0,040	0,044		

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов этих полиморфных маркеров в группах больных СД типа 1 и здоровых индивидов не выявил статистически значимых различий (табл. 3 и 4).

В случае полиморфного маркера *rs2069762* (*A/C*) гена *IL2* аллель *A* встречается чаще аллеля *C*. Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *rs2069762* гена *IL2* в группах больных СД типа 1 и здоровых индивидов также не выявил статистически значимых различий (табл. 5).

Таблица 5.

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *rs2069762* гена *IL2* в группах “СД1+” и “СД1–”

Аллели и генотипы	Частота аллелей и генотипов		χ^2	<i>p</i>
	“СД1+” (n = 177)	“СД1–” (n = 206)		
Аллель <i>A</i>	0,637	0,595	0,54	0,46
Аллель <i>C</i>	0,362	0,405		
Генотип <i>AA</i>	0,408	0,345	1,12	0,57
Генотип <i>AC</i>	0,459	0,500		
Генотип <i>CC</i>	0,133	0,155		

Полученные в нашей работе результаты по ассоциации полиморфных маркеров генов *IL2* и *IL2RA* с СД типа 1, существенно отличаются от результатов, полученных в европейских популяциях западной части Европы, где исследуемые полиморфные маркеры показывали существенную ассоциацию с СД типа 1 (рис. 3). Это, возможно, объясняется определенной спецификой аутоиммунной регуляции Т-лимфоцитов у людей русского происхождения.

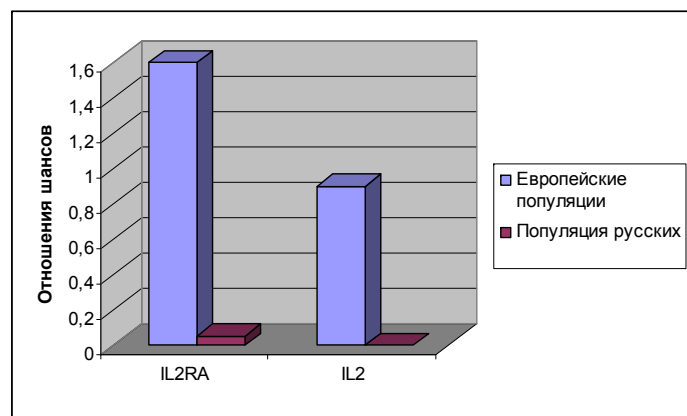


Рис. 3. Сравнение значений *OR* для полиморфных маркеров генов *IL2RA* и *IL2* в различных популяциях.

Несомненно, что сигнальный путь *IL-2/IL-2R* важен для поддержания уровня регуляторных Т-клеток, играющих ключевую роль в развитии СД типа 1. Однако существует множество других генетических факторов, в большей степени определяющих этиологию развития СД типа 1 у людей русского происхождения, например, ген *SH2B3* имеет более выраженное влияние на развитие СД типа 1 у русских, чем у больных из западноевропейских популяций.

2.3. Исследование ассоциации полиморфного маркера *rs333* гена *CCR5* с СД типа 1.

Рецептор хемокинов типа 5 (*CCR5*), как и все рецепторы, сопряженные с G-белками, имеет внеклеточный N-концевой участок, 7 трансмембранных доменов, соединенных внеклеточными и 3 внутриклеточными петлями, и цитоплазматический C-концевой участок. Одновременная экспрессия рецепторов *CD4* и *CCR5* наблюдается в Т-лимфоцитах, в частности Т-хелперах типа 1 (Th1), а также в дендритных клетках, моноцитах и макрофагах. Вариант гена *CCR5*, содержащий делецию 32 п.н. в кодирующей области гена, приводит к синтезу укороченного и функционально неактивного варианта рецептора из-за сдвига рамки считывания. При этом у гетерозиготных носителей уровень синтеза рецептора *CCR5* понижен, а у гомозиготных носителей синтез функционально активного рецептора *CCR5* полностью отсутствует вследствие мутации.

CCR5 играет важную роль в регулировании иммунного ответа типа Th1, ведущего к аллогенному подавлению β-клеток островков Лангерганса при СД типа 1. Моноциты периферической крови больных с недавно выявленным СД типа 1 показывают сниженную экспрессию хемокиновых рецепторов *CCR5*, ассоциированных с Th1. Хорошо изучена роль хемокинов в качестве аттрактантов для наивных и эффекторных Т-клеток. В новых исследованиях доказано, что хемокины имеют важное значение в регулировании Т-клеточной

дифференцировки, а также влияют на поляризацию иммунного ответа по пути Th1 или Th2.

В недавних работах было показано, что аллель *del32* гена *CCR5* с высокой частотой обнаруживается у носителей аллелей *HLA-DRB1*01* и *DRB1*04*. Ассоциация варианта *del32* гена *CCR5* была обнаружена с такими аутоиммунными заболеваниями, как рассеянный склероз, целиакия и СД типа 1. При этом авторы отмечают, что механизм развития данных заболеваний сходен и в значительной степени связан с аутоиммунной неспецифичной реакцией Т-лимфоцитов на периферические ткани организма и интолерантностью к антигенам, поступающим с пищей.

В нашем исследовании, как в группе больных СД типа 1, так и в группе здоровых индивидов преобладал аллель без делеции 32 п.н. (аллель *A*, более 80%), то же самое характерно и для генотипов (генотип *AA*, более 70%). Различия между частотами аллелей *A* и *del32* в группах “СД+” и “СД-” были статистически недостоверны. В тоже время нами были обнаружены статистически значимые различия при сравнении частот генотипов в тех же группах больных (табл. 6).

Таблица 6.

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *rs333* гена *CCR5* в группах “СД1+” и “СД1-”

Аллели и генотипы	Частоты аллелей и генотипов		χ^2	<i>p</i>	OR [CI 95%]
	“СД1+” (n = 366)	“СД1-” (n = 526)			
Аллель <i>A</i>	0,856	0,887	2,26	0,13	0,75[0,52 – 1,09]
Аллель <i>del32</i>	0,144	0,113			1,32[0,92 – 1,91]
Генотип <i>A/A</i>	0,751	0,779	9,78	0,008	0,86[0,57 – 1,29]
Генотип <i>A/del32</i>	0,209	0,216			0,96[0,62 – 1,48]
Генотип <i>del32/del32</i>	0,040	0,005			8,56[1,72 – 40,6]

Однако, при сравнении частот генотипов было обнаружено статистически достоверное увеличение частоты генотипа *del32/del32* (*p* = 0,008) в группе больных СД типа 1, что говорит об ассоциации этого генотипа с повышенным риском развития данной патологии и повышенном риске развития СД типа 1 у носителей генотипа *del32/del32* (табл. 6).

Полученные нами данные не совпадают с результатами, полученными на британской популяции и подтвержденными на семьях из нескольких европейских стран. В этом исследовании было показано, что носители аллеля *del32* гена *CCR5* имеют пониженный риск развития СД типа 1.

Следует отметить, что вклад гена *CCR5* в формирование предрасположенности к СД типа 1 минимален, как в русской, так и в британской популяциях. Обнаруженные нами противоречия, возможно, связаны с эпистатическим взаимодействием генов комплекса HLA класса II с генами, включенными в аутоиммунную реакцию, одним из которых является *CCR*.

Тем не менее, на основании полученных нами данных можно сделать вывод, что носители аллеля *del32* гена *CCR5* имеют повышенный риск развития аутоиммунного СД типа 1 среди русских больных, проживающих в г. Москва.

2.4. Исследование ассоциации полиморфного маркера *rs3087243* гена *CTLA4* с СД типа 1.

Ассоциация гена *CTLA4* с СД типа 1 установлена с точностью до блока неравновесия по сцеплению, содержащего весь ген (рис.4).

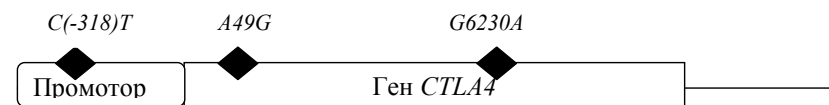


Рис. 4. Схематичное расположение полиморфных маркеров гена *CTLA4*, ассоциированных с СД типа 1.

В нашем исследовании аллель *G* полиморфного маркера *rs3087243* (*G6230A*) гена *CTLA4* был преобладающим в группах больных и здоровых

индивидов. Однако частота аллеля *A* у здоровых индивидов существенно превышала частоту аллеля *A* в группе больных (табл. 7). Генотип *AA* встречался реже в группе больных СД типа 1 в сравнении с контрольной группой (11,3% и 22,1%, соответственно), а частоты генотипа *GG* были выше у больных СД типа 1 по сравнению с группой здоровых индивидов (44,7 и 37,5%, соответственно). Исходя из этих данных можно сделать вывод, что носители аллеля *G* и генотипа *GG* имеют повышенный риск развития СД типа 1, в то время как носители аллеля *A* и генотипа *AA* имеют пониженный риск развития заболевания (табл. 7).

Таблица 7.

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *rs3087243* гена *CTLA4* в группах “СД1+” и “СД1–”

Аллели и генотипы	Частоты аллелей и генотипов		χ^2	<i>p</i>	OR[CI 95%]
	СД1+ (n = 366)	СД1– (n = 526)			
Аллель <i>A</i>	0,333	0,423	11,80	0,0006	0,68[0,55 – 0,85]
Аллель <i>G</i>	0,667	0,577			1,47[1,18 – 1,83]
Генотип <i>AA</i>	0,113	0,221	13,62	0,001	0,45[0,29 – 0,70]
Генотип <i>AG</i>	0,440	0,405			1,15[0,85 – 1,56]
Генотип <i>GG</i>	0,447	0,375			1,35[1,00 – 1,83]

Из полученных нами результатов следует, что полиморфный маркер *rs3087243* гена *CTLA4* высоко достоверно ассоциирован с СД типа 1 у больных русского происхождения. Однако в настоящее время сделать окончательный вывод о том, какой из четырех изученных к настоящему времени маркеров (полиморфный микросателлит *(AT)n*, *A49G*, *C(-318)T* и *G6230A*) гена *CTLA4* определяет наибольший вклад в развитие СД типа 1, затруднительно.

Это связано с тем, что все эти маркеры достоверно ассоциированы с СД типа 1 и в тоже время не сцеплены между собой (рис. 4). Для маркеров *A49G* и *C(-318)T* показана функциональная значимость. У носителей аллеля *A* (*Ala*)

полиморфного маркера *A49G* снижено содержание молекул CTLA-4 на поверхности клеток. А у носителей аллеля *T* полиморфного маркера *C(-318)T* имеет место повышенная активность промотора гена *CTLA4*, что приводит к снижению уровня активации Т-клеток.

В случае двух других маркеров (полиморфный микросателлит *(AT)n* и *G6230A*) функциональная значимость до настоящего времени обнаружена не была. Однако это не означает, что они не оказывают влияния на реализацию функций молекул CTLA-4. Нам представляется, что в данной ситуации при расчете риска развития СД типа 1 следует учитывать совокупное влияние всех изученных маркеров.

2.5. Исследование ассоциации полиморфного маркера *rs10509540* гена *RNLS* с СД типа 1.

Полные геномные поиски ассоциаций позволили выявить еще один ген-кандидат *RNLS*, продуктом которого является реналаза – фермент, синтезируемый почками. Реналаза была открыта в результате исследований сигнальных белков, способных воздействовать на функцию сердечно-сосудистой системы. Исследования реналазы показали, что этот фермент, относящийся к группе аминоксидаз, циркулирует в крови и разрушает катехоламины. Плазматическая активность данного фермента выявлена только в условиях стимуляции синтеза или при инфузии катехоламинов. Несмотря на то, что реналаза также вырабатывается в сердце, скелетных мышцах и печени – основным источником реналазы являются почки. Об этом свидетельствует отсутствие компенсаторного увеличения концентрации фермента при терминальной почечной недостаточности.

Особое внимание обращает на себя полиморфный маркер *rs10509540*, так как в ряде исследований, проведенных на больных СД типа 1 из европейских популяций, была обнаружена ассоциация полиморфного маркера *rs10509540* гена *RNLS* с СД типа 1. Так в работе группы ученых из Кембриджского института медицинских исследований было показано, что носители аллеля *C*

имеют пониженный риск развития СД типа 1. Носители гомозиготного генотипа *CC* имели более поздний возраст манифестации СД типа 1 (9,5 лет по сравнению с 8,9).

В нашем исследовании частота аллеля *T* была преобладающей (табл. 8). Соответственно преобладал среди групп пациентов и больных СД типа 1 генотип *TT*. Статистически значимого отличия между группами “СД1+” и “СД1-” найдено не было.

Таблица 8.

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *rs10509540* гена *RNLS* в группах “СД1+” и “СД1-”

Аллели и генотипы	Частоты аллелей и генотипов		χ^2	<i>p</i>
	“СД1+”(n = 366)	“СД1-“(n = 526)		
Аллель <i>T</i>	0,792	0,742	1,43	0,23
Аллель <i>C</i>	0,208	0,258		
Генотип <i>TT</i>	0,623	0,533	1,62	0,45
Генотип <i>TC</i>	0,338	0,417		
Генотип <i>CC</i>	0,039	0,050		

Исследования ассоциации гена *RNLS* были проведены сравнительно недавно. Его роль в регулировании иммунной системы практически неизвестна. В нашем исследовании ассоциация гена *RNLS* с СД типа 1 обнаружена не была. Для более полного понимания его роли в функционировании иммунной системы нужны дополнительные исследования, в том числе молекулярных механизмов регулирования иммунной системы.

3. Разработка диагностической тест-системы для ранней диагностики риска развития СД типа 1.

К настоящему времени разработано множество методов идентификации аллелей полиморфных маркеров, но из-за сложности или дороговизны тестов наиболее используемым в мире методом для редко встречающихся маркеров

по-прежнему остается прямое определение нуклеотидных последовательностей. В условиях РФ секвенаторы встречаются, как правило, только в крупных научных центрах, что делает для региональной медицины недоступной или очень затратной диагностику заболеваний, для которых не существует на рынке молекулярно-генетических тест-систем.

Более удобным и чувствительным способом является метод диагностики, основанный на амплификации ДНК «в реальном времени», но на данный момент в РФ отсутствуют приемлемые по соотношению цена/качество диагностические тест-системы зарубежного и отечественного производства, что делает невозможным массовое внедрение этого метода в практику лабораторной диагностики для СД типа 1.

Нами был выбран метод идентификации генотипов, основанный на использовании явления переноса энергии с помощью флуоресцентного резонанса (FRET). Данный вариант технологии TaqMan на основе разрушаемых олигонуклеотидных зондов с химическими модификациями LNA (locked nucleic acids) позволяет добиться высоких показателей чувствительности и специфичности тест-системы и преодолеть такие недостатки других подходов как низкая специфичность и частые ложноположительные результаты. Разработанный нами метод универсален и может быть применен для любых полиморфных маркеров или мутаций.

Исходя из данных литературных источников и полученных нами экспериментальных данных, для создания диагностической тест-системы гены нами были выбраны локус HLA и гены *INS*, *SH2B3*, *PTPN22*, *PTPN2*, *PTPN11*, *CLEC16A* и *CTLA4*, как вносящие наибольший вклад в генетическую предрасположенность к СД типа 1. Суммарно полиморфные маркеры локуса HLA и этих генов определяют до 95% генетического риска развития СД типа 1 в русской популяции.

Идентификацию генотипов полиморфных маркеров генов проводили методом детекции флуоресценции «по конечной точке» на термоциклере “ABI 7500 Fast” (Applied Biosystems) с помощью встроенных средств программного

обеспечения SDS версии 1.4. На рисунке 5 представлен пример распределения генотипов одного из исследованных полиморфных маркеров при проведении ПЦР “в реальном” времени. На осях абсцисс и ординат отмечена степень флуоресценции сигналов.

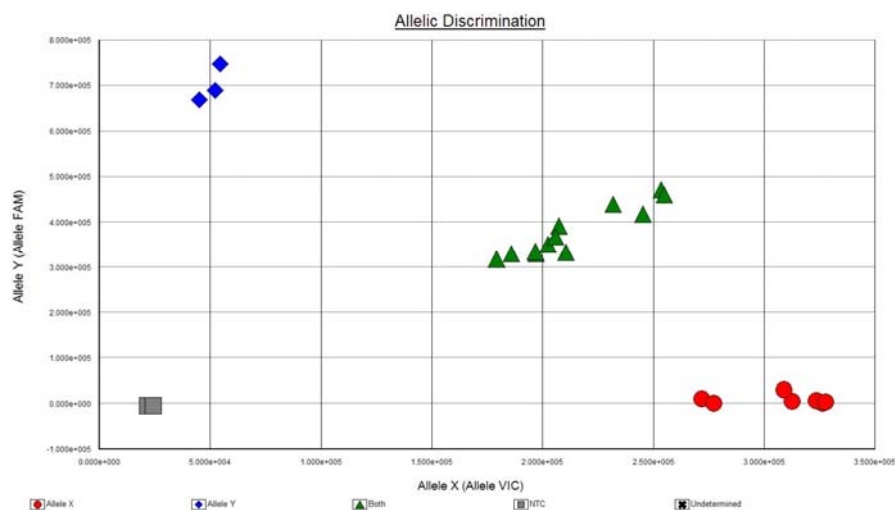


Рис. 5. Распределение генотипов маркера *rs3087243* гена *CTLA4* после проведения ПЦР “в реальном” времени. Аллель Y - аллель A, \blacklozenge -генотип AA, аллель X - аллель G, \bullet - генотипы GG, \blacktriangle - генотип AG, \blacksquare - отрицательный контроль (ДНК отсутствует).

Итоговые данные для расчета риска развития СД типа 1 приведены в таблице 9. Разработанный нами метод обладает высокой селективностью и, в зависимости от общего количества ДНК в образце, позволят выявлять, как минимум, 1% минорного аллеля на фоне геномной ДНК с точностью не менее 99,9%. Данная селективность и предел чувствительности теста не уступают аналогичным показателям других методов, и превосходят секвенирование с терминаторными красителями.

Таблица 9.

Сводная таблица результатов анализа полиморфных маркеров, гены приведены в порядке уменьшения вклада в патогенез СД типа 1

Ген	Полиморфный маркер	OR [CI 95%] для аллеля повышенного риска
<i>HLA</i>	<i>rs2040410</i> <i>rs7454108</i>	15,19 [8,03–30,12]
<i>CTLA4</i>	<i>rs3087243</i>	3,09 [1,84–4,67]
<i>INS</i>	<i>rs689</i>	2,03 [1,44–2,85]
<i>SH2B3</i>	<i>rs3184504</i>	1,94 [1,45–2,58]
<i>PTPN22</i>	<i>rs2476601</i>	1,77 [1,14–2,55]
<i>PTPN2</i>	<i>rs2847281</i>	1,57 [1,15–2,14]
<i>PTPN11</i>	<i>rs11066284</i>	1,55 [1,07–2,24]
<i>CLEC16A</i>	<i>rs2903692</i>	1,41 [1,04–1,90]

ВЫВОДЫ

1. Изучена ассоциация полиморфных маркеров *rs2040410* и *rs7454108* локуса HLA с СД типа 1 с помощью метода ПЦР в “реальном времени”. Установлено, что данный метод является наиболее эффективным при исследовании ассоциации генов локуса HLA с СД типа 1.
2. Определены частоты аллелей и генотипов ряда полиморфных маркеров генов *IL2RA*, *IL2*, *CCR5*, *CTLA4*, *RNLS* в группе больных СД типа 1 и группе здоровых индивидов среди русских г. Москвы.
3. Для полиморфных маркеров *rs41295061* и *rs11594656* гена *IL2RA*, полиморфного маркера *rs2069762* гена *IL2* и полиморфного маркера *rs10509540* гена *RNLS* показано отсутствие ассоциации с СД типа 1.
4. Обнаружена ассоциация полиморфного маркера *rs333* гена *CCR5* с СД типа 1. Установлено, что носители генотипа *del32/del32* данного полиморфного маркера имеют повышенный риск, тогда как носители аллеля A имеют пониженный риск развития СД типа 1.

5. Обнаружена ассоциация полиморфного маркера *rs3087243* гена *CTLA4* с СД типа 1. Установлено, что носители аллеля *G* и генотипа *GG* имеют повышенный риск, в то время как носители аллеля *A* и генотипа *AA* имеют пониженный риск развития СД типа 1.
6. Разработан опытный образец диагностической тест-системы, в состав которой входят полиморфные маркеры локуса HLA и генов *INS*, *SH2B3*, *PTPN22*, *PTPN2*, *PTPN11*, *CLEC16A* и *CTLA4*, определяющие до 95% генетического риска развития СД типа 1 в русской популяции.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Копылова О.И., Кураева Т.Л., Лаврикова Е.Ю., Титович Е.В., Никитин А.Г., Петеркова В.А., Носиков В.В., Дедов И.И. (2012) Полиморфные маркеры генов *IL2RA* и *IL2*: популяционные различия в ассоциации с сахарным диабетом. *Сахарный диабет*, (1), 14 – 18.
2. Копылова О.И., Кураева Т.Л., Лаврикова Е.Ю., Титович Е.В., Никитин А.Г., Смирнова Г.Е., Петеркова В.А., Дедов И.И., Носиков В.В. (2012) Ассоциация полиморфного маркера *G6230A* гена *CTLA4* с сахарным диабетом 1-ого типа у больных русского происхождения. *Проблемы эндокринологии*, 58(4), 14 – 17.
3. Копылова О.И., Лаврикова Е.Ю., Никитин А.Г., Носиков В.В. Однонуклеотидный полиморфизм в гене *PTPN2*, ассоциированный с сахарным диабетом типа 1. *Материалы X международной конференции для молодых ученых “Biochemical physics” и школы “Modern problem of biochemical physics”*, стр. 123 – 124, Москва, Россия (8 – 10 ноября 2010 г.).
4. Копылова О.И. Ассоциация полиморфных маркеров генов *IL2* и *IL2RA* с сахарным диабетом типа 1 у больных русского происхождения. *Материалы международной конференции для молодых ученых “Ломоносов 2012”*, стр.82-83, Москва, Россия (21 – 27 сентября 2012г.).
5. Kopylova O.I., Lavrikova E.Y., Nikitin A.G., Zilberman L.I., Kuraeva T.L., Peterkova V.A., Nosikov V.V. Association of *IL2* and *IL2RA* genes with type 1

diabetes mellitus in Russian population of Moscow. *Abstracts of the 4th international IMBG conference for young scientists “Molecular biology: advances and perspectives”* p.71, Kiev, Ukraine (September 14 – 17, 2011).

6. Копылова О.И., Кураева Т.Л., Лаврикова Е.Ю., Никитин А.Г., Титович Е.В., Смирнова Г.Е., Петеркова В.А., Дедов И.И., Носиков В.В. Ассоциация полиморфных маркеров генов *IL2* и *IL2RA* с сахарным диабетом 1 типа. *Материалы VI Всероссийского конгресса эндокринологов*, стр. 32, Москва, Россия (27 – 31 мая 2012 г.).
7. Лаврикова Е.Ю., Кураева Т.Л., Никитин А.Г., Копылова О.И., Титович Е.В., Смирнова Г.Е., Петеркова В.А., Дедов И.И., Носиков В.В. Ассоциация хромосомной области 16p13 с сахарным диабетом типа 1. *Материалы VI Всероссийского конгресса эндокринологов*, стр. 33, Москва, Россия (27 – 31 мая 2012 г.).