

*На правах рукописи*

**ЧЕРНЫШЕВА АНА**

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С  
ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬЮ К САХАРНОМУ ДИАБЕТУ ТИПА 1,  
НА ХРОМОСОМАХ 1, 2, 5 И 16**

**03.00.03 - Молекулярная биология**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

**Москва – 2007**

Работа выполнена в лаборатории молекулярной диагностики и геномной дактилоскопии Государственного научно-исследовательского института генетики и селекции промышленных микроорганизмов (ФГУП «ГосНИИгенетика»).

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор  
Носиков Валерий Вячеславович

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор  
Асанов Алий Юрьевич

кандидат физико-математических наук  
Казаченко Константин Юрьевич

Ведущая организация: Институт экспериментальной кардиологии,  
Российский Кардиологический Научно-  
производственный Комплекс МЗ РФ

Защита состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 200 г. в \_\_\_ 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 «ГосНИИгенетика».

Реферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 200 г.

Ученый секретарь  
Диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

Заиграева Г.Г.

## 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 сахарного диабета 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 сахарного диабета типа 1 имеет полигенный характер. По-видимому, существует несколько десятков генов, продукты которых прямо или косвенно вовлечены в его патогенез. В отличие от моногенных синдромов, сочетающихся с различными нарушениями углеводного обмена, при аутоиммунном сахарном диабете типа 1 причина заболевания лежит не в мутациях отдельных генов. 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.

При реализации подхода генетического картирования, часто используемого в исследованиях полигенных, многофакторных наследственных заболеваний, поиск генов-кандидатов начинают не с функций, а с хромосомной локализации. Для этого проводится детальное картирование участков сцепления на всех хромосомах человека с использованием групп полиморфных маркеров и семей с наличием заболевания у сибсов. Затем в участках, показавших максимальное сцепление с сахарным диабетом типа 1, изучают функции конкретных генов и исследуют ассоциацию с заболеванием полиморфных маркеров в этих генах.

Установление ассоциации генов с заболеванием необходимо для понимания природы процессов, приводящих к сахарному диабету типа 1, и для оценки его индивидуального и популяционного генетического риска.

**Цель работы.** Целью данной работы являлся поиск полиморфных маркеров, ассоциированных с генетической предрасположенностью к сахарному диабету типа 1, на хромосомах 1q42, 2q31-33, 2q35, 5q31.1-33.1 и 16q22-24.

Для ее достижения были поставлены следующие задачи:

1. Провести анализ сцепления и ассоциации с сахарным диабетом типа 1 группы полиморфных маркеров в хромосомной области 1q42 с использованием семей с наличием заболевания у сибсов.
2. Провести анализ сцепления и ассоциации с сахарным диабетом типа 1 группы микросателлитных полиморфных маркеров в хромосомной области 16q22-24.
3. Провести анализ сцепления и ассоциации с сахарным диабетом типа 1 группы микросателлитных полиморфных маркеров в хромосомных областях 2q31-33 и 2q35.
4. Провести анализ сцепления и ассоциации с сахарным диабетом типа 1 однонуклеотидного полиморфного маркера в гене *IL12B* в хромосомной области 5q31.1-33.1.

5. При наличии ассоциации проанализировать функции генов в областях 1q42 и 16q22-24, определить гены, которые по своим функциям могут быть задействованы в развитии СД типа 1.

**Научная новизна работы** В данной работе впервые была изучена ассоциация полиморфных маркеров в хромосомных областях 1q42, 2q31-33, 2q35, 5q31.1-33.1 и 16q22-24 с сахарным диабетом типа 1 у пациентов из городских популяций России. Обнаружена статистически достоверная ассоциация с СД типа 1 в областях 1q42 и 2q35.

Проводились исследования функций генов в хромосомной области 1q42 в связи с их возможным участием в развитии сахарного диабета типа 1. На роль генов-кандидатов предложены гены *TAF5L*, *ABCB10* и *KIAA0133*, связанные с предрасположенностью к СД типа 1.

**Практическая ценность работы.** Изучение ассоциации полиморфных маркеров с сахарным диабетом типа 1 позволит оценить относительный (популяционный) и абсолютный (индивидуальный) риск развития заболевания в популяциях России, прогнозировать его развитие и прогрессирование задолго до клинического проявления и, наконец, правильно формировать группы риска. Эти исследования также могут способствовать наиболее эффективному проведению профилактики сахарного диабета (мониторинг лиц группы риска, использование иммуномодуляторов и/или иммуносупрессоров, превентивной инсулинотерапии и др.), а также обучению лиц, уже заболевших СД, самоконтролю уровня глюкозы в крови, проведению интенсивной инсулинотерапии и т.д.

**Апробация работы.** Диссертационная работа была представлена на заседании Секции молекулярной биологии Ученого совета ФГУП "ГосНИИ генетика" от 14 февраля 2007 г. Результаты настоящей работы докладывались на Третьем Российском Диабетологическом Конгрессе (2004 г.), на V-ом Съезде Российского общества медицинских генетиков (2005 г.), на V-ом Всероссийском конгрессе эндокринологов "Высокие медицинские технологии в эндокринологии" (2006 г.) и 43-ем Ежегодном Конгрессе Европейской Ассоциации по изучению диабета (EASD – 2007 г.).

**Публикации.** По материалам работы опубликовано 6 печатных работ, включая 3 статьи, а также материалы докладов и сообщений на 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 122 страницах машинописного текста и содержат 24 таблицы и 9 рисунков.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### 1. Изучение сцепления и ассоциации полиморфных маркеров в хромосомной области 1q42 с сахарным диабетом (СД) типа 1.

Группа пациентов была сформирована из 35 семей с конкордантными по заболеванию парами сибсов и 72 семей с дискордантными парами сибсов, представляющих городское население Москвы и Самары. Семьи содержали двух родителей и как минимум двух сибсов. В работе использовалась геномная ДНК, выделенная из цельной крови.

Одним из значимых локусов по вкладу в семейный риск развития заболевания является 1q42, расположенный на хромосоме 1. Он был обнаружен во второй работе по полному геномному поиску (Concannon et al, 1998). Проведенные ранее другими авторами исследования позволили выделить в хромосомной области 1q42 небольшую область сцепления с СД типа 1 размером около 250 т.п.н (Ewens et al, 2002). В этой области по данным NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) к настоящему времени обнаружены три сильно сцепленных гена: *TAF5L*, *ABCB10* и *KIAA0133*.

В настоящем исследовании была поставлена задача исследовать сцепление и ассоциацию хромосомной области 1q42 с сахарным диабетом типа 1 в городских популяциях больных г. Москвы и г. Самары. Нами были выбраны 6 полиморфных маркеров, суммарно перекрывающих область длиной около 4,5 м.п.н. Из них в интервале 1,5 м.п.н. находятся 5 маркеров, и только маркер *D1S1644* удален от остальных на 3 м.п.н. (Табл. 1). Аллели и генотипы каждого из этих полиморфных маркеров были определены во всей группе из 107 семей с СД типа 1. Для идентификации аллелей использовалось разделение в полиакриламидном геле амплифицированных фрагментов ДНК, содержащих внутри себя полиморфный маркер.

Таблица 1.

Характеристика полиморфных маркеров, расположенных в хромосомной области 1q42.

Маркер	Расстояние от 1q-ter, м.п.н.	Тип полиморфизма	Число аллелей	Длины фрагментов, п.н.
<i>D1S1644</i>	222,82	STR 4-нукл.	5	265 - 281
<i>D1S1617</i>	226,01	STR 3-нукл.	5	118 - 130
<i>D1S2847</i>	226,17	STR 2-нукл.	6	156 - 166
<i>D1S1668</i>	226,99	STR 4-нукл.	4	179 - 191
<i>D1S103</i>	227,14	STR 2-нукл.	5	82 - 90
<i>D1S225</i>	227,47	STR 2-нукл.	7	111 - 123

На рис. 1 показан пример разделения амплифицированных фрагментов ДНК для локуса *D1S2847*. Для определения размеров фрагментов ДНК нами проводилось их сравнение с аллельными "лестницами", специально разрабатываемыми для каждого из маркеров в отдельности.

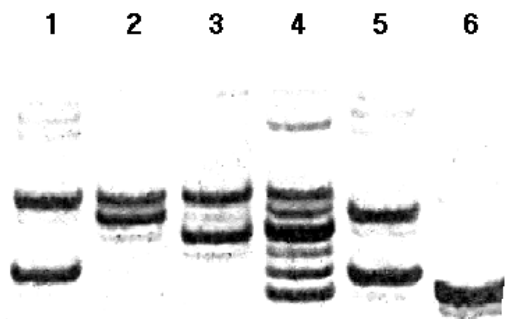


Рисунок 1. Пример разделения амплифицированных фрагментов ДНК, соответствующих определенным аллелям полиморфного маркера *D1S2847* в 10% полиакриламидном геле. На дорожке 4 – аллельная "лестница", содержащая аллели 156 - 166. Генотипы по остальным дорожкам следующие: 1 - 158/166; 2 – 164/166; 3 – 162/166; 5 - 158/164; 6 - 156/156.

### 1.1. Сцепление полиморфных маркеров *D1S1644*, *D1S1617*, *D1S2847*, *D1S1668*, *D1S103* и *D1S225* с сахарным диабетом типа 1.

Оценка сцепления полиморфных маркеров с СД типа 1 проводилась только на ядерных семьях с конкордантными парами сибсов. Для каждого аллеля вычислялся LOD-балл, характеризующий вероятность совместного наследования или отсутствия наследования этого аллеля обоими сибсами одновременно (Risch, 1990). Эта величина отражает корреляцию между идентичными по происхождению сибсами. Наличие корреляции свидетельствует о сцеплении полиморфного маркера с заболеванием. Максимальный LOD-балл (MLS) вычислялся как максимум значений LOD по всем аллелям. Значение MLS соответствует десятичному логарифму отношения шансов за и против сцепления полиморфного маркера с заболеванием.

Результаты проведенного исследования приведены в виде кривой сцепления, на которой по оси абсцисс отложена хромосомная локализация полиморфного маркера в м.п.н., а по оси ординат – величина MLS (рис. 2).

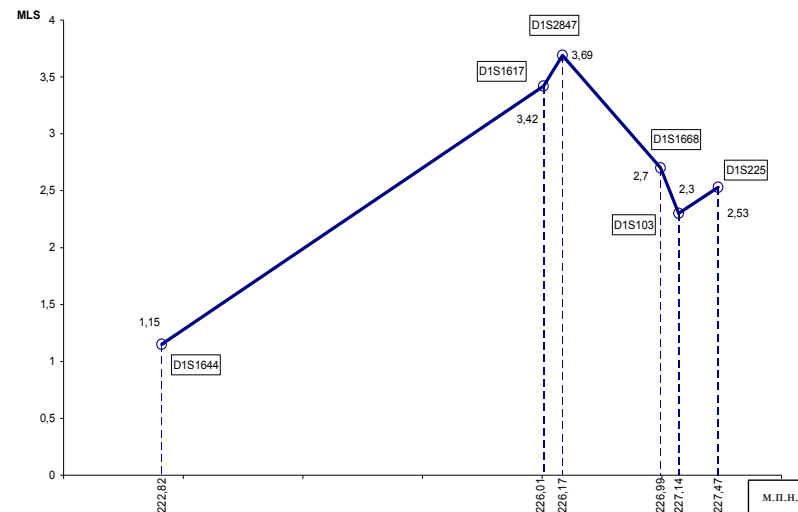


Рисунок 2. Кривая сцепления с СД типа 1 в области 1q42 по данным о 6-ти полиморфных маркерах. Приведена локализация маркеров и значения MLS.

Обращает на себя внимание классический характер кривой в виде колокола. Максимум находится вблизи полиморфных маркеров *D1S2847* (MLS = 3,69) и *D1S1617* (MLS = 3,42), что соответствует значимому сцеплению (MLS > 3,5). Предположительное сцепление (MLS > 2,2) показано и для маркеров *D1S1668* (MLS = 2,70), *D1S103* (MLS = 2,30) и *D1S225* (MLS = 2,53). Таким образом, сразу пять маркеров в хромосомной области 1q42 сцеплены с сахарным диабетом типа 1.

Расположение области максимального сцепления при исследовании в двух российских городских популяциях полностью соответствует данным для других этнических групп. Действительно, наиболее часто упоминаемым в связи со сцеплением с СД типа 1 в работах по геномному поиску является полиморфный маркер *D1S1617* (Concannon et al, 1998; Ewens et al, 2002), который находится на расстоянии 160 т.п.н. от полиморфного маркера *D1S2847*. Таким образом, области максимального сцепления полностью перекрываются.

#### 1.2. Ассоциация полиморфных маркеров *D1S1644*, *D1S1617*, *D1S2847*, *D1S1668*, *D1S103* и *D1S225* с сахарным диабетом типа 1.

Для оценки ассоциации с заболеванием использовался метод неравновесной передачи аллелей от родителей к больным сибсам - TDT (Spielman et al, 1993). Вычислялась величина  $\chi^2$ , которая является мерой различий между числом сибсов, которым передается аллель, и числом сибсов, которым он не передается. Модификация метода неравновесной передачи аллелей, S-TDT, основана на оценке различий передачи аллелей в сибсовых парах (Spielman et al, 1998). Здесь различия вычислялись между частотами передачи аллелей здоровым и больным сибсам. Тест S-TDT в чистом виде не проводился, вместо него проводился объединенный тест, сочетающий в себе результаты как TDT, так и S-TDT (Spielman et al, 1998). Величина  $Z'$ , рассчитываемая в объединенном тесте, является мерой относительного риска развития заболевания в случае наличия у пробанда определенного аллеля полиморфного маркера.

В исследованиях полиморфных маркеров с числом аллелей больше двух, вводилась поправка Бонферрони на число множественных сравнений. Значения достоверности  $p$  дополнительно умножались на величину (N-1), где

N – это число аллелей полиморфного маркера. Необходимость введения данной поправки обусловлена тем фактом, что данные для разных аллелей не являются независимыми.

Для проверки приведенных результатов о наличии сцепления с сахарным диабетом типа 1 в хромосомной области 1q42 провели альтернативное исследование неравновесной передачи аллелей от родителей к больным сибсам (TDT), показывающее наличие или отсутствие ассоциации с заболеванием. Тест проводился на всех типах семей для каждого из 6 полиморфных маркеров. В таблице 2 приведены результаты как собственно теста TDT, так и объединенного теста S-TDT + TDT только для полиморфных маркеров, показавших ассоциацию с заболеванием.

**Таблица 2.**

**Передача в семьях с СД типа 1 больным сибсам аллелей полиморфных маркеров *D1S2847* и *D1S1617*, а также результаты объединенного теста TDT и S-TDT.**

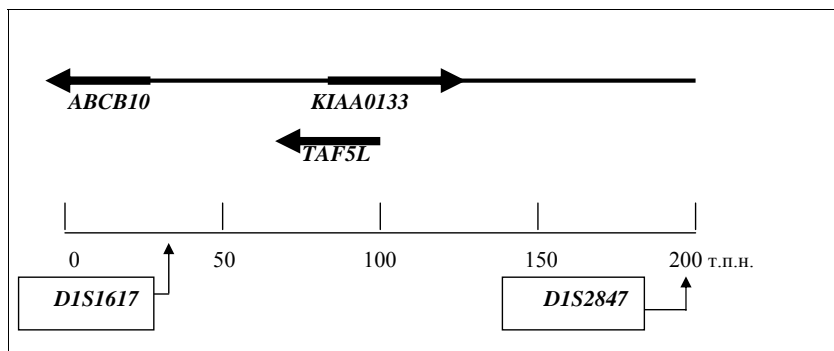
Аллель	TDT-тест				Объединенный тест	
	Передается	Не передается	$\chi^2$	$p_c$	$Z'$	$p_c$
<i>D1S1617</i>						
118	30	38				
121	15	28				
124	50	57				
<b>127</b>	<b>47</b>	<b>24</b>	<b>7,451</b>	<b>0,025</b>	<b>2,611</b>	<b>0,018</b>
130	18	15				
<i>D1S2847</i>						
156	23	45				
158	12	16				
160	18	27				
<b>162</b>	<b>59</b>	<b>23</b>	<b>15,805</b>	<b>0,0005</b>	<b>3,905</b>	<b>0,001</b>
164	16	15				
166	0	2				

Статистически значимая ассоциация с СД типа 1 обнаружена для тех же маркеров *D1S1617* и *D1S2847*, для которых было показано сцепление с заболеванием. Так, аллель 127 полиморфного маркера *D1S1617* и аллель 162 полиморфного маркера *D2S2847* передаются чаще больным детям (табл.2), что свидетельствует о предрасполагающем характере данных аллелей.

Для аллелей всех остальных маркеров уровень значимости  $p_c < 0,05$  не был достигнут, хотя в некоторых случаях и для них существует слабая тенденция к неравновесной передаче в семьях больных СД типа 1. Таким образом, тест на ассоциацию (TDT) полностью подтвердил данные теста на сцепление о том, что расположенные друг от друга на расстоянии 160 т.п.н. полиморфные маркеры *D1S1617* и *D1S2847* связаны с сахарным диабетом типа 1 в российских семьях.

Принимая во внимание тот факт, что определенный нами интервал максимального сцепления в точности совпадает с таковым в других этнических группах, правомерно сделать предположение о том, что предрасположенность к СД типа 1 в области 1q42 во всех этих группах вызвана полиморфным маркером в одном и том же гене.

Исследования связи конкретных генов в хромосомной области 1q42 с СД типа 1 проводились на группе больных Европы и Северной Америки (Ewens et al., 2002). Эти исследования показали ассоциацию некоторых полиморфных маркеров в генах *KIAA0133*, *TAF5L* и *CAPN9*. В данной работе были рассмотрены гены, локализация которых в этой области была подтверждено экспериментально (рис. 3).



**Рисунок 3.** Карта хромосомной области 1q42 с указанием полиморфных маркеров, показавших сцепление с СД типа 1 в настоящей работе (*D1S1617* и *D1S2847*) и в работах других авторов. Кроме того, показаны гены, существование которых подтверждено экспериментально.

Ген *ABCB10* входит в большую семью генов, кодирующих интегральные белки мембран, продукты всех этих генов используют АТФ в качестве источника энергии и осуществляют перенос через мембраны ионов и различных низкомолекулярных соединений. Эти белки очень консервативны и встречаются в клетках как прокариотов, так и эукариотов. Белок *ABCB10* относится к подсемейству MDR/TAP, члены которого ответственны за устойчивость к лекарствам. Продукт гена *ABCB10* расположен на внутренней мембране митохондрий и предполагается, что его функцией является перенос соединений, необходимых для синтеза гема (Solomon et al., 2004).

Об ассоциации генов, кодирующих белки данного семейства с СД типа 1 никаких сведений нет. Однако, было установлено что рецептор сульфонил-мочевины, который является одним из двух компонентов калиевых каналов (*ABCC8*), участвующих в секреции инсулина из  $\beta$ -клеток при СД типа 2, относится к этому же семейству белков.

Продукт гена *TAF5L* входит в состав комплекса PCAF, состоящего из 20 полипептидов и осуществляющего ацетилирование гистонов. *TAF5L*, также как и другие белки семейства TAF, играет важную роль в процессе транскрипции в целом. Кроме того, эти белки являются коактиваторами транскрипции, участвуют как в узнавании промоторных последовательностей, так и во взаимодействии с другими факторами транскрипции, что облегчает формирование транскрипционного комплекса и инициацию транскрипции. Изучение ассоциации однонуклеотидных полиморфных маркеров гена *TAF5L* с СД типа 1 в популяции больных Европы и Северной Америки уже проводилось и один маркер дал значимое отклонение ( $p = 0,0006$ ) в популяции больных по сравнению с здоровыми индивидами (Ewens et al., 2002).

Ген *KIAA0133* кодирует продукт, функции которого еще пока недостаточно изучены, но предполагается, что этот белок похож на белки, связывающие ламин, которые в свою очередь, участвуют в процессах связывания хроматина с ядерной мембраной, а также в процессах синтеза ДНК, транскрипции и апоптоза. Для населения Европы и Северной Америки уже показано значимое отклонение ( $p = 0,04$ ) в популяции больных СД типа 1 по сравнению со здоровыми особями для одного из однонуклеотидных полиморфных маркеров в гене *KIAA0133* (Ewens et al., 2002).

На первом этапе работы были проанализированы 6 однонуклеотидных полиморфных маркеров, расположенных в данных трех генах. Среди них два однонуклеотидных полиморфных маркера, *T150G* и *A301G* расположены в экзоне гена *ABCB10* и один в интроне этого же гена. Маркеры *A454G* и *G248T* расположены в экзоне гена *TAF5L*, а маркер *G778T* в экзоне гена *KIAA0133*. Однако, два однонуклеотидных полиморфных маркера в гене *ABCB10* (в интроне и в экзоне *T150G*) оказались неpolиморфными в популяции г. Москвы и не использовались в дальнейшем исследовании.

Данные обо всех полиморфных маркерах были получены из баз данных dbSNP и UniSTS Национального центра биоинформатики (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov). В случае каждого из этих четырех маркеров (*A301G*, *A454G*, *G248T* и *G778T*) были идентифицированы аллели и генотипы во всех 107 семьях больных СД типа 1.

### 1.3. Изучение ассоциации однонуклеотидных полиморфных маркеров *A301G*, *A454G*, *G248T* и *G778T* с СД типа 1.

Для идентификации аллелей однонуклеотидных полиморфных маркеров использовали метод амплификации фрагментов ДНК, содержащих внутри себя полиморфные маркеры с последующим расщеплением этих фрагментов рестриктазами, узнающими последовательность одного из аллелей. Разделение образующихся фрагментов ДНК проводили в 10% полиакриламидном геле.

Аллели полиморфного маркера *A301G* определяли с помощью рестриктазы *BstSFI*, расщепляющей амплифицированный фрагмент длиной 533 п.н. Фрагмент, содержащий аллель *G*, оставался нерасщепленным, в то время как фрагмент, содержащий аллель *A*, расщеплялся на фрагменты длиной 203 и 330 п.н. (рис. 4). Аналогичным образом, амплифицированный фрагмент ДНК длиной 91 п.н., содержащий аллель *A* полиморфного маркера *A454G*, расщеплялся рестриктазой *Hin6I* на фрагменты длиной 61 и 30 п.н., а в случае полиморфного маркера *G248T* рестриктаза *BstFNI* расщепляла фрагмент, содержащий аллель *G*, на фрагменты длиной 201 и 110 п.н. Для определения аллелей полиморфного маркера *G778T* использовалась рестриктаза *BsoMAI*. Фрагмент длиной 311 п.н., содержащий аллель *T*, она расщепляла на две части с длинами 201 и 110 п.н., а фрагмент, содержащий аллель *G*, не расщепляла.

По результатам как теста TDT, так и объединенного теста, не было обнаружено никаких значимых различий в частотах передачи аллелей полиморфных маркеров *A301G* в гене *ABCB10*, *G248T* в гене *TAF5L* и *G778T* в гене *KIAA0133* в семьях с СД типа 1. Таким образом, ассоциация с СД типа 1 у данных полиморфных маркеров отсутствует.

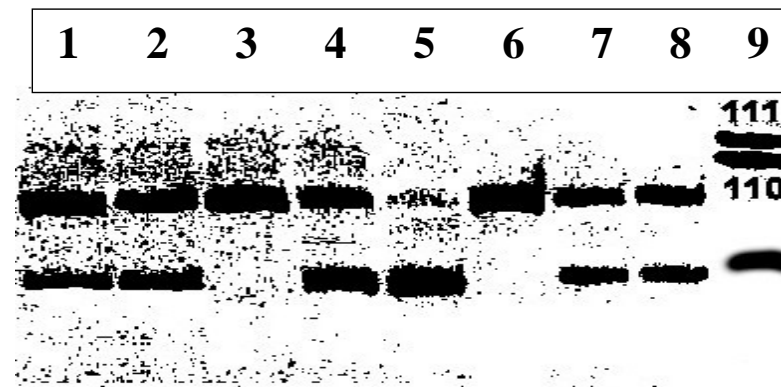


Рисунок 4. Пример разделения в 10% полиакриламидном геле аллелей полиморфного маркера *A454G* после амплификации и расщепления рестриктазой *Hin6I*. Длины фрагментов: аллель *A* – 91 п.н., аллель *G* – 61 п.н. Генотипы по дорожкам: 1, 2, 4, 7, 8 - *A/G*; 3, 6 - *A/A*; 5 - *G/G*. Изображение сканировано.

Для полиморфного маркера *A454G* в гене *TAF5L*, напротив, ассоциация с СД типа 1 была обнаружена (табл. 3). Аллель *A* данного маркера достоверно чаще передается больным детям (75 семей против 47,  $\chi^2 = 3,509$ ,  $p = 0,061$ ). Объединенный тест также подтверждает наличие ассоциации ( $Z' = 2,034$ ,  $p = 0,021$ ).

Таблица 3.

Передача в семьях с СД типа 1 больным sibсам аллелей полиморфного маркера *A454G*, а также результаты объединенного теста TDT и S-TDT.

Аллели	TDT				Объединенный тест (TDT+S-TDT)	
	Передается	Не передается	$\chi^2$	<i>P</i>	$Z'$	<i>p</i>
<i>A</i>	67	47	3,509	0,061	2,034	0,021
<i>G</i>	47	67				

Таким образом, аллель *A* полиморфного маркера *A454G* в гене *TAF5L* является фактором повышенного риска развития СД типа 1 в исследуемых нами городских популяциях России. Однако этот факт не может быть безусловным свидетельством роли самого гена *TAF5L* в патогенезе данного заболевания. Возможно, что маркер *A454G* находится в неравновесии по сцеплению с другим пока неизвестным полиморфным маркером, локализованном в одном из соседних генов в той же хромосомной области.

## 2. Изучение сцепления и ассоциации полиморфных маркеров в хромосомной области 16q22-24 с СД типа 1.

Область сцепления в районе 16q22-24 была обнаружена в первых работах по геномному поиску (Mein et al, 1998). Область максимального сцепления окружает полиморфный динуклеотидный маркер *D16S3098* и ее размер составляет примерно 2,0 м.п.н. Однако, все последующие исследования не смогли подтвердить тот факт, что данный локус вовлечен в формирование предрасположенности к сахарному диабету типа 1 (Concannon et al., 1998, Kristiansen et al., 1999).

В настоящем исследовании была поставлена задача изучить сцепление и ассоциацию локуса 16q22-24, используя для анализа семьи русского происхождения. Нами были отобраны 5 полиморфных маркеров, суммарно перекрывающих область длиной около 6,5 м.п.н. Из них в интервале 3,0 м.п.н. находятся 4 маркера, и только маркер *D16S3118* удален от остальных на 3,0 м.п.н. (табл. 4).

Таблица 4.

### Характеристика полиморфных маркеров, расположенных в хромосомной области 16q22-24.

Маркер	Расстояние от 16q-ter, т.п.н.	Тип полиморфизма	Число аллелей	Длина фрагментов, п.н.
<i>D16S3118</i>	76112	STR 2-нукл.	7	109 - 127
<i>D16S750</i>	79438	STR 4-нукл.	3	109 - 117
<i>D16S3073</i>	79732	STR 2-нукл.	6	172 - 182
<i>D16S3098</i>	81228	STR 2-нукл.	5	157 - 165
<i>D16S422</i>	82691	STR 2-нукл.	13	188 - 212

Аллели и генотипы каждого из полиморфных маркеров были определены во всей группе из 107 семей с СД типа 1. Для идентификации аллелей использовалось разделение в полиакриламидном геле амплифицированных фрагментов ДНК, содержащих внутри себя полиморфный маркер. На рис. 5 показан пример такого разделения для локуса *D16S3098*.

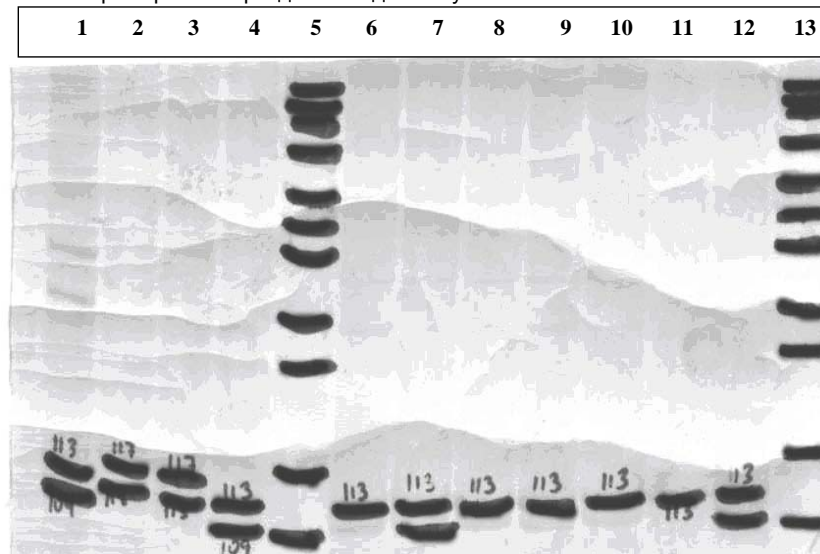


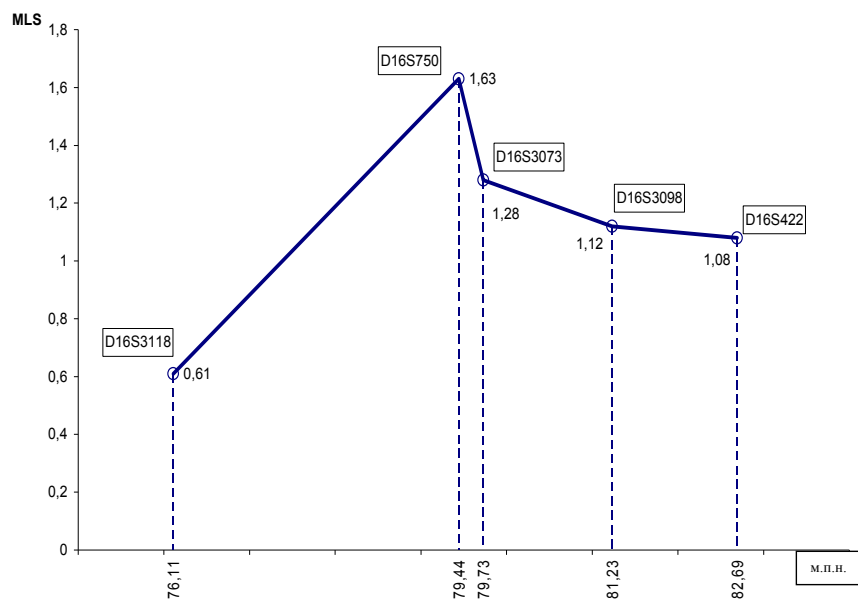
Рисунок 5. Пример разделения амплифицированных аллелей полиморфного маркера *D16S750* в 10% полиакриламидном геле. На дорожках 5 и 13 – маркер *pBR322/MspI*, с аллелями 110 и 121 п.н. Генотипы по остальным дорожкам следующие : 1 - 109/113; 2 – 113/117; 3 – 113/117; 4 - 109/113; 6 – 113/113; 7 – 109/113; 8, 9, 10, 11 – 113/113, 12 - 109/113.

### 2.1. Сцепление полиморфных маркеров *D16S3118*, *D16S750*, *D16S3073*, *D16S3098* и *D16S422* с сахарным диабетом типа 1.

Результаты исследования приводятся в виде кривой сцепления, на которой по оси абсцисс отложена хромосомная локализация полиморфного маркера в м.п.н., а по оси ординат – величина MLS (рис. 6). Обращает на себя внимание классический характер кривой в виде колокола. Максимум находится вблизи полиморфного маркера *D16S750* (MLS = 1,68), что не соответствует



предположительному сцеплению ( $MLS > 2,2$ ). Таким образом, ни один из маркеров в хромосомной области 16q22-24 не сцеплен с сахарным диабетом типа 1.



**Рисунок 6. Кривая сцепления с СД типа 1 в области 16q22-24 по данным о 5-ти полиморфных маркерах. Приведена локализация маркеров и значения MLS.**

## 2.2. Ассоциация полиморфных маркеров *D16S3118*, *D16S750*, *D16S3073*, *D16S3098* и *D16S422* с сахарным диабетом типа 1.

Для проверки приведенных результатов о наличии сцепления с сахарным диабетом типа 1 в хромосомной области 16q22-24 провели альтернативное исследование неравновесной передачи аллелей от родителей к больным сибсам (TDT), показывающее наличие или отсутствие ассоциации с заболеванием. Тест проводился на всех типах семей для каждого из 5 полиморфных маркеров.

Статистически значимая ассоциация не была обнаружена ни для одного из исследованных полиморфных маркеров, хотя в некоторых случаях существует слабая тенденция к неравновесной передаче аллелей в семьях

больных СД типа 1. Таким образом, тест на ассоциацию (TDT) полностью подтвердил данные теста на сцепление о том, что локус 16q22-24 не связан с сахарным диабетом типа 1 в российских семьях.

## 3. Изучение сцепления и ассоциации полиморфных маркеров в хромосомной области 2q31-33 с СД типа 1.

Локус *IDDM7* в хромосомной области 2q31-33 был обнаружен в первых работах по геномному поиску (Davies et al, 1994). Область сцепления окружает полиморфный динуклеотидный маркер *D2S152*. Результаты полученные в разных этнических группах очень гетерогенны - от сильной ассоциации данного маркера с сахарным диабетом типа 1 (Copeman et al., 1995), через слабую ассоциацию (Luo et al., 1995), до ее полного отсутствия (Buhler et al., 1997). В проведенных работах были получены данные свидетельствующие о том, что полиморфный маркер *Ala45Thr* в гене *NeuroD/Beta2*, который кодирует белок участвующий в инициации транскрипции гена инсулина, ассоциирован с сахарным диабетом типа 1 (Iwata et al., 1999), но в последующих работах было показано что ассоциация данного полиморфного маркера не может объясняться неравновесием по сцеплению с *IDDM7*, а, возможно, является отдельным локусом предрасположенности к сахарному диабету типа 1 (Hansen et al., 2000).

В настоящем исследовании была поставлена задача изучения сцепления и ассоциации полиморфных маркеров, расположенных в хромосомной области 2q31-33, используя для анализа семьи русского происхождения. Нами были отобраны два полиморфных маркера, суммарно перекрывающие область длиной около 1,5 м.п.н. (табл. 5).

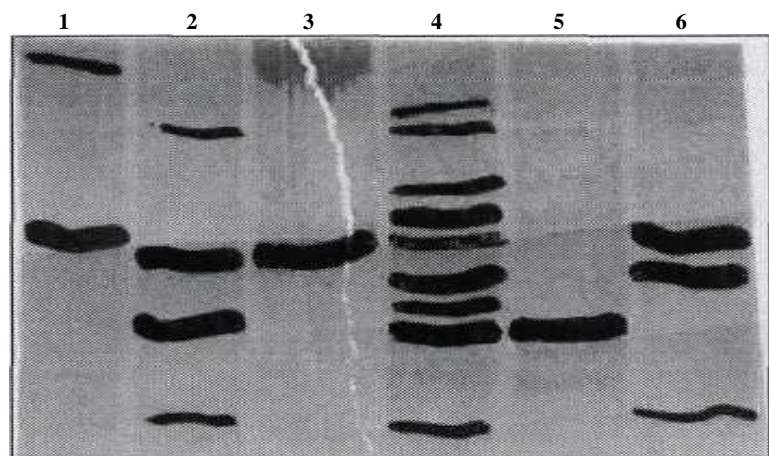
**Таблица 5.**

### Характеристика полиморфных маркеров, расположенных в хромосомной области 2q31-33.

Маркер	Расстояние от 16q-ter, м.п.н.	Тип полиморфизма	Число аллелей	Длина фрагментов, п.н.
<i>D2S152</i>	188,00	STR 2-нукл.	9	269 - 285
<i>D2S1775</i>	189,50	STR 4-нукл.	6	115 - 135

Аллели и генотипы каждого из полиморфных маркеров были определены во всей группе из 107 семей с СД типа 1. Для идентификации аллелей

использовалось разделение в полиакриламидном геле амплифицированных фрагментов ДНК, содержащих внутри себя полиморфный маркер. На рис. 7 показан пример такого разделения для локуса *D2S1775*.



**Рисунок 7.** Пример электрофоретического разделения аллелей полиморфного микросателлитного маркера *D2S1775* в 10% ПААГ. На дорожке 4 - аллельная "лестница" с аллелями 115, 119, 123, 127, 131 и 135 п.н. Генотипы по остальным дорожкам следующие: 1 - 127/127; 2 - 119/127; 3 - 127/127; 5 - 115/115; 6 - 123/127.

### 3.1. Сцепление полиморфных маркеров *D2S152* и *D2S1775* с сахарным диабетом типа 1.

Оценка сцепления полиморфных маркеров с СД типа 1 проводилась только на ядерных семьях с конкордантными парами сибсов. Результаты исследования приводятся в таблице 6. Максимальное значение LOD-балла в данном исследовании было получено для маркера *D2S152* (MLS = 2,41), что соответствует предположительному сцеплению. Для маркера *D2S1775* максимальный LOD-балл был равен 1,41, что ниже порога значимого сцепления (табл. 6).

Таким образом, можно сделать вывод, что маркер *D2S152*, расположенный в хромосомной области 2q31-33, слабо сцеплен с сахарным диабетом типа 1 в семьях больных русского происхождения.

**Таблица 6.**

### Результаты анализа сцепления маркеров *D2S152* и *D2S1775* в хромосомной области 2q31-33 в семьях больных русского происхождения

Маркер	MLS	$P_c$
<i>D2S152</i>	2,41	0,064
<i>D2S1775</i>	1,14	NS

### 3.2. Ассоциация полиморфных маркеров *D2S152* и *D2S1775* с сахарным диабетом типа 1.

Для проверки полученных нами результатов о наличии сцепления с сахарным диабетом типа 1 в хромосомной области 2q31-33 нами было проведено альтернативное исследование неравновесной передачи аллелей от родителей к больным сибсам (TDT). Тест проводился на всех типах семей для каждого из двух полиморфных маркеров.

Статистически значимая ассоциация не была показана ни для одного из исследованных полиморфных маркеров, хотя в некоторых случаях существует слабая тенденция к неравновесной передаче аллелей в семьях больных СД типа 1. Таким образом, тест на ассоциацию (TDT) не подтвердил данные теста на сцепление о том, что локус 2q31-33 связан с сахарным диабетом типа 1 в российских семьях.

### 4. Изучение сцепления и ассоциации полиморфных маркеров в хромосомной области 2q35 с СД типа 1.

Одним из значимых локусов по вкладу в семейный риск развития заболевания является локус *IDDM13*, расположенный в хромосомной области 2q35. В ряде исследований была обнаружена ассоциация полиморфных микросателлитных маркеров *D2S137* (Fu et al., 1998), *D2S157* (Esposito et al., 1998), *D2S164* и *D2S1471* (Larsen et al., 1999), расположенных в области 2q35. В этом районе расположен ген *IA-2*, кодирующий аутоантиген, ген *NRAMP1*, кодирующий белок необходимый для нормальной функции макрофагов, ген белка - транспортера *ABCB12*, а также гены белка, связывающего подобные инсулину факторы роста 2 и 5 - *IGFBP2* и *IGFBP5*, соответственно. Однако, ни

для одного из этих генов не было найдено подтверждения того что они могут быть возможными генами-кандидатами для *IDDM13* (Esposito et al. 1998, Annilo et al. 2002, Owerbach et al., 1997).

В настоящем исследовании была поставлена задача изучения сцепления и ассоциации полиморфных маркеров, расположенных в локусе 2q35, используя для анализа семьи русского происхождения. Нами были отобраны 5 полиморфных маркеров, суммарно перекрывающих область длиной около 10 м.п.н. Из них в интервале 4 м.п.н. находятся 4 маркера, и только маркер *D2S157* удален от остальных на 6 м.п.н. (табл. 7). Аллели и генотипы каждого из полиморфных маркеров были определены во всей группе из 107 семей с СД типа 1. Для идентификации аллелей использовалось разделение в полиакриламидном геле амплифицированных фрагментов ДНК, содержащих внутри себя полиморфный маркер.

**Таблица 7.**

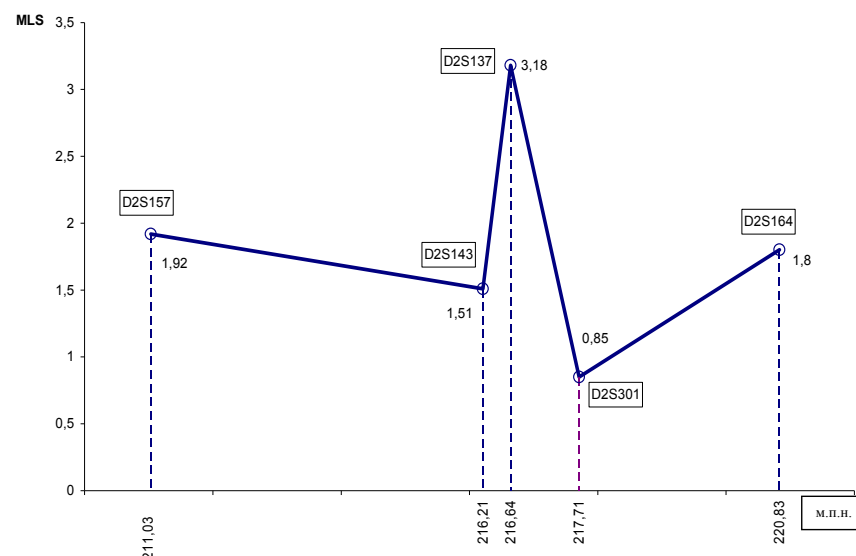
**Характеристика полиморфных маркеров, расположенных в хромосомной области 2q35.**

Маркер	Расстояние от 16q-ter, м.п.н.	Тип полиморфизма	Число аллелей	Длина фрагментов, п.н.
<i>D2S157</i>	211,03	STR 2-нукл.	10	103 - 122
<i>D2S143</i>	216,21	STR 2-нукл.	7	109 - 121
<i>D2S137</i>	216,64	STR 2-нукл.	9	142 - 158
<i>D2S301</i>	217,71	STR 2-нукл.	6	224 - 234
<i>D2S164</i>	220,83	STR 2-нукл.	8	265 - 279

**4.1. Сцепление полиморфных маркеров *D16S3118*, *D16S750*, *D16S3073*, *D16S3098* и *D16S422* с сахарным диабетом типа 1.**

Оценка сцепления полиморфных маркеров с СД типа 1 проводилась только на ядерных семьях с конкордантными парами сибсов. Результаты исследования приводятся на рис. 8. Максимальное значение LOD-балла в данном исследовании было получено для полиморфного маркера *D2S137* (MLS = 3,18), что соответствует предположительному сцеплению (MLS > 2,2). Остальные проанализированные маркеры не показали предположительного

сцепления. Таким образом, один из маркеров (*D2S137*), расположенный в хромосомной области 2q35, достоверно сцеплен с сахарным диабетом типа 1.



**Рисунок 8. Кривая сцепления с СД типа 1 в области 2q35 по данным о 5 полиморфных маркерах. Приведена локализация маркеров и значения MLS.**

**4.2. Ассоциация полиморфных маркеров *D2S157*, *D2S143*, *D2S137*, *D2S301* и *D2S164* с сахарным диабетом типа 1.**

Для проверки приведенных результатов о наличии сцепления с сахарным диабетом типа 1 в хромосомной области 2q35 нами было проведено альтернативное исследование неравновесной передачи аллелей от родителей к больным сибсам (TDT), показывающее наличие или отсутствие ассоциации с заболеванием. Тест проводился на всех типах семей для каждого из 5 полиморфных маркеров.

Статистически значимая ассоциация была обнаружена только в случае полиморфного маркера *D2S137*, для которого ранее было показано предположительное сцепление. В табл. 8 приведены результаты как

собственно теста TDT, так и объединенного теста S-TDT + TDT только для полиморфного маркера *D2S137*, показавшего ассоциацию с заболеванием.

**Таблица 8.**

**Передача в семьях с СД типа 1 больным сибсам аллелей полиморфного маркера *D2S137*, а также результаты объединенного теста TDT и S-TDT.**

Аллель	TDT-тест				Объединенный тест	
	Передается больным сибсам	Не передается больным сибсам	$\chi^2$	$p_c$	Z'	$p_c$
142	6	12				
144	0	0				
146	16	25				
148	25	19				
150	31	33				
<b>152</b>	<b>46</b>	<b>19</b>	<b>11,215</b>	<b>0,0064</b>	<b>3,225</b>	<b>0,0048</b>
154	8	6				
156	10	23				
158	7	9				

Статистически значимая ассоциация с СД типа 1 обнаружена для того же маркера *D2S137*, для которого было показано сцепление с заболеванием. Так, аллель 152 полиморфного маркера *D2S137* передается чаще больным детям (табл. 8), что свидетельствует о предрасполагающем характере данного аллеля.

Для аллелей всех остальных маркеров уровень значимости  $p_c < 0,05$  не был достигнут, хотя в некоторых случаях и для них существует слабая тенденция к неравновесной передаче в семьях больных СД типа 1.

Таким образом, тест на ассоциацию (TDT) полностью подтвердил данные теста на сцепление о том, что полиморфный маркер *D2S137* связан с сахарным диабетом типа 1 в российских семьях.

## 5. Изучение сцепления и ассоциации полиморфных маркеров в хромосомной области 5q31.1-33.1 с СД типа 1.

Локус *IDDM18* в хромосомной области 5q31.1-33.1 был обнаружен сравнительно недавно, в работах с использованием мышей линии NOD

(Adorini, 2001). Ген *IL12B*, кодирует субъединицу p40 интерлейкина 12 (IL-12), который является одним из ключевых цитокинов, необходимых для развития и созревания Th-1 клеток. Подтверждение того, что полиморфный маркер *C1159A* действительно ассоциирован с сахарным диабетом типа 1 было получено при анализе популяций больных Австралии и Великобритании (Morahan et al., 2001). Аллель A преимущественно передавался больным сибсам. Однако, эти данные в последствии не были подтверждены при изучении 795 семей с дискордантными парами сибсов из Европы и Америки и 337 семей с конкордантными парами сибсов датского происхождения (Bergholdt et al., 2004).

В настоящем исследовании была поставлена задача изучения сцепления и ассоциации полиморфных маркеров, расположенных в локусе *IDDM18* в хромосомной области 5q31.1-33.1, используя для анализа семьи русского происхождения. Нами были отобраны 2 полиморфных маркера - один в 3'-нетранслируемой области гена *IL12B* и один на расстоянии 540 т.п.н. дистально от этого гена (табл. 9).

**Таблица 9.**

**Характеристика полиморфных маркеров, расположенных в хромосомной области 5q31.1-33.1.**

Маркер	Расстояние от 5q-тер, м.п.н.	Тип полиморфизма	Число аллелей	Длина фрагментов, п.н.
<i>D5S2060</i>	158,13	STR 2-нукл.	11	108 - 128
<i>C1159A</i>	158,67	SNP	2	323

Аллели и генотипы каждого из полиморфных маркеров были определены во всей группе из 107 семей с СД типа 1. Аллели полиморфного маркера *C1159A* определяли после обработки рестриктазой TaqI, расщепляющей амплифицированный фрагмент ДНК длиной 323 п.н. Фрагмент, содержащий аллель A, оставался нерасщепленным, в то время как фрагмент, содержащий аллель C, расщеплялся на фрагменты 185 и 138 п.н.

### 5.1. Сцепление полиморфных маркеров *D5S2060* и *C1159A* с сахарным диабетом типа 1.

Оценка сцепления полиморфных маркеров с СД типа 1 проводилась только на ядерных семьях с конкордантными парами сибсов. Результаты

исследования приводятся в табл. 10. Максимальное значение LOD-балла в данном исследовании было получено для маркера *D5S2060* ( $MLS = 1,58$ ), что не соответствует предположительному сцеплению ( $MLS > 2,2$ ). Для маркера *C1159A* максимальный LOD-балл был равен 0,31 (табл. 10).

**Таблица 10.**

**Результаты анализа сцепления в хромосомной области 5q31.1-33.1.**

Маркер	<i>MLS</i>	<i>P<sub>c</sub></i>
<i>D5S2060</i>	1,58	NS
<i>C1159A</i>	0,31	NS

Таким образом, маркеры *D5S2060* и *C1159A* в хромосомной области 5q31.1-33.1 не сцеплены с сахарным диабетом типа 1 в семьях больных русского происхождения.

**5.2. Ассоциация полиморфных маркеров *D5S2060* и *C1159A* с сахарным диабетом типа 1.**

Для проверки приведенных результатов о наличии сцепления с сахарным диабетом типа 1 в хромосомной области 5q31.1-33.1 провели альтернативное исследование неравновесной передачи аллелей от родителей к больным сибсам (TDT), показывающее наличие или отсутствие ассоциации с заболеванием. Тест проводился на всех типах семей для каждого из двух полиморфных маркеров.

Статистически значимая ассоциация не была показана ни для одного из исследуемых полиморфных маркеров.

Таким образом, тест на ассоциацию (TDT) подтвердил данные о том, что локус 5q31.1-33.1 не связан с сахарным диабетом типа 1 в российских семьях.

**ВЫВОДЫ**

1. Изучена передача в 107 семьях больных сахарным диабетом типа 1 аллелей полиморфных маркеров *D1S1644*, *D1S1617*, *D1S2847*, *D1S1668*, *D1S103* и *D1S225*, расположенных в хромосомной области 1q42. Показано наличие высоко достоверной ассоциации с заболеванием для полиморфных маркеров *D1S1617* и *D1S2847*.
2. Исходя из результатов, полученных при анализе сцепления и ассоциации полиморфных маркеров, расположенных в хромосомной области 1q42,

высказано предположение о возможной роли генов *TAF5L*, *ABCB10* и *KIAA0133* в патогенезе сахарного диабета типа 1. Проведен анализ сцепления и ассоциации однонуклеотидных полиморфных маркеров, расположенных в этих генах. Для полиморфного маркера *A454G* в экзоне гена *TAF5L*, получена значимая ассоциация с заболеванием, по данным о всех 107 семьях с наличием заболевания у сибсов. Аллель *A* этого маркера чаще передавался больным сибсам, что говорит о том что данный аллель или аллель который с ним находится в неравновесии по сцеплению, является фактором повышенного риска развития заболевания.

3. Проанализированы сцепление и ассоциация с сахарным диабетом типа 1 пяти полиморфных микросателлитных маркеров, расположенных в области 16q22-24, в 107 семьях больных сахарным диабетом типа 1. Сцепление и ассоциация с заболеванием в хромосомной области 16q22-24 не обнаружены, по данным о всех 107 семьях с наличием заболевания у сибсов.
4. Изучены сцепление и ассоциация с сахарным диабетом типа 1 двух полиморфных микросателлитных маркеров, расположенных в хромосомной области 2q31-33 (*IDDM7*) в 107 семьях больных сахарным диабетом типа 1. Обнаружено слабое сцепление с сахарным диабетом типа 1 полиморфного микросателлитного маркера *D2S152*. Не показано положительной ассоциации данного маркера, по данным о всех 107 семьях с наличием заболевания у сибсов.
5. Изучены сцепление и ассоциация с сахарным диабетом типа 1 пяти полиморфных микросателлитных маркеров, расположенных в хромосомной области 2q35 (*IDDM13*) в 107 семьях больных сахарным диабетом типа 1. Обнаружено сцепление с сахарным диабетом типа 1 полиморфного микросателлитного маркера *D2S137*. Показана положительная ассоциация аллеля *152* данного маркера с сахарным диабетом типа 1, по данным о всех 107 семьях с наличием заболевания у сибсов. Данный аллель является фактором повышенного риска развития патологии.
6. Изучены сцепление и ассоциация с сахарным диабетом типа 1 полиморфного микросателлитного маркера *D5S2060* и однонуклеотидного маркера *C1159A* в 3'-нетранслируемой области гена *IL12B*, расположенных в хромосомной области 5q31.1-33.1 (*IDDM18*). Сцепление и ассоциация с

заболеванием в данной хромосомной области не обнаружены, по данным о всех 107 семьях с наличием заболевания у сибсов.

#### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Чернышева, А., Зильберман, Л.И., Савостьянов, К.В., Цитлидзе, Н.М., Кураева, Т.Л., Петеркова, В.А., Дедов И.И., Носиков, В.В. (2007) Ассоциация хромосомной области 5q31.1-q33.1 (*IDDM18*) с сахарным диабетом типа 1 среди русских, проживающих в г. Москве. *Сахарный диабет*, (2), 6-8.
2. Chistiakov, D.A., Chernisheva, A., Savost'yanov, K.V., Turakulov, R.I., Kuraeva, T.L., Dedov, I.I., Nosikov, V.V. (2005) Lack of association between genetic markers on chromosome 16q22-q24 and type 1 diabetes in Russian affected families. *Croat. Med. J.*, 46(4), 670-677.
3. Chistiakov, D.A., Chernisheva, A., Savost'yanov, K.V., Turakulov, R.I., Kuraeva, T.L., Dedov, I.I., Nosikov, V.V. (2005) The *TAF5L* gene on chromosome 1q42 is associated with type 1 diabetes in Russian affected patients. *Autoimmunity*, 38(4), 283-293.
4. Носиков, В.В., Кураева, Т.Л., Серегин Ю.А., Зильберман Л.И., Савостьянов К.В., Титович Е.В., Чернышева А., Петеркова В.А., Дедов И.И. Геномика сахарного диабета типа 1. Материалы *Третьего Российского Диабетологического Конгресса*, стр.43, г. Москва, Россия (24 - 27 мая 2004 г.).
5. Носиков, В.В., Кураева, Т.Л., Серегин, Ю.А., Зильберман, Л.И., Савостьянов, К.В., Титович, Е.В., Чернышева, А., Петеркова, В.А., Дедов, И.И. Геномика сахарного диабета типа 1. Материалы *V Съезда Российского общества медицинских генетиков*, стр. 241, г. Уфа, Россия (24 - 27 мая 2005). *Медицинская генетика*, 4(5), 241 (2005).
6. Носиков, В.В., Кураева, Т.Л., Чернышева, А., Зильберман, Л.И., Савостьянов, К.В., Цитлидзе, Н.М., Петеркова, В.А., Дедов И.И. Молекулярная генетика сахарного диабета типа 1: достижения и перспективы. Материалы *V Всероссийского конгресса эндокринологов "Высокие медицинские технологии в эндокринологии"*, стр. 40, Москва, Россия (30 октября – 2 ноября 2006 г.).