

На правах рукописи

ЛАВРИКОВА ЕЛЕНА ЮРЬЕВНА

**АССОЦИАЦИЯ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ ТИПА 1 ПОЛИМОРФНЫХ
МАРКЕРОВ В ХРОМОСОМНОЙ ОБЛАСТИ 12q24 И ГЕНАХ *INS*,
PTPN22, *PTPN2* И *CLEC16A***

03.01.03 – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2010

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

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор,
ФГУП «ГосНИИ генетика»

Носиков Валерий Вячеславович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор,
Московская медицинская академия
им. И.М. Сеченова

Асанов Алий Юрьевич

доктор биологических наук, профессор,
Институт молекулярной биологии
им. В.А. Энгельгардта РАН

Прасолов Владимир Сергеевич

Ведущая организация:

ГУ Медико-генетический научный центр
РАМН

Защита состоится «__» мая 2010 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 «__» апреля 2010 г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета,
кандидат химических наук

Воюшина Т.Л.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Сахарный диабет типа 1 (СД типа 1) – широко распространенное, тяжело протекающее заболевание, приводящее к ранней инвалидности и преждевременной смерти больных. СД типа 1 относится к одному из наиболее серьезных эндокринных заболеваний человека. В Российской Федерации насчитывается более 5 млн. больных с этой формой диабета. СД типа 1 является наследственным аутоиммунным заболеванием и представляет собой не только медицинскую, но и серьезную социальную проблему. В целом средняя продолжительность жизни больных СД типа 1, заболевших в детстве, на 20 лет меньше, чем средняя продолжительность жизни в общей популяции.

В настоящее время СД типа 1 относят к многофакторным, полигенным заболеваниям. Многофакторная модель наследования предполагает, что проявление болезни определяется взаимодействием средовых и генетических факторов. Под генетическими факторами при этом подразумевают определенные аллели ряда полиморфных генов, вовлеченных в развитие СД типа 1, которые в клинической практике получили название аллелей, предрасполагающих к развитию СД типа 1. До настоящего времени в русской популяции с использованием подхода «ген-кандидат» удалось надежно идентифицировать только две хромосомные области, содержащие гены, связанные с предрасположенностью к развитию СД типа 1. Это локус МНС (главный комплекс гистосовместимости) и ген *CTLA4*, кодирующий поверхностный рецептор Т-клеток.

В последние годы обнаружена ассоциация с СД типа 1 ряда новых локусов, в том числе и на основе полных геномных поисков с использованием микрочипов высокой плотности. Однако эти данные относятся, главным образом, к больным СД типа 1, происходящим из Великобритании. Необходимость проведения аналогичных исследований на русской популяции не вызывает сомнений, так как известно, что вклад различных генов в формирование предрасположенности к СД типа 1 существенно различается в разных популяциях, а вычисление генетического риска для пациента требует наличия информации о распределении частот аллелей и генотипов для популяции, к которой он принадлежит, что исключает использование данных, полученных для других популяций.

Установление ассоциации полиморфных маркеров с СД типа 1 у больных русского происхождения поможет разработать дифференцированный подход к профилактике и лечению данной патологии.

Цель и задачи работы. Целью данной работы было изучение ассоциации полиморфных маркеров ряда генов-кандидатов с развитием сахарного диабета типа 1. Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Определить частоты аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов, кодирующих тирозинфосфатазы типа 2, 11 и 22 (*PTPN2*, *PTPN11*, *PTPN22*), тирозиновую киназу, являющуюся рецептором эпидермальных факторов роста типа 3 (*ERBB3*), представителя семейства лектинов типа С (*CLEC16A*), адаптерный белок Lnk (*SH2B3*), проинсулин (*INS*) и альфа-цепь рецептора интерлейкина 2 (*IL2RA*) в группе больных СД типа 1 и группе здоровых индивидов среди русских г. Москвы.

2. Провести сравнительный анализ распределения аллелей и генотипов полиморфных маркеров данных генов-кандидатов в исследованных выборках больных и здоровых индивидов для выявления ассоциации изученных маркеров с развитием болезни и определения вклада данных генов в наследственную предрасположенность к СД типа 1.

Научная новизна работы. В данной работе впервые в России исследована ассоциация полиморфных маркеров *-23HphI (rs689)* гена *INS*, *Trp262Arg (rs3184504)* гена *SH2B3*, *C1858T (rs2476601)* гена *PTPN22*, *rs2847281*, *rs2542151*, *rs3737361*, *rs547268* и *rs2542156* гена *PTPN2*, *rs2903692* и *rs725613* гена *CLEC16A*, *rs2292239* гена *ERBB3*, *rs17696736*, *rs12425405*, *rs11066284*, *rs7974468* и *rs11066301* гена *PTPN11*, *rs41295061* и *rs11594656* гена *IL2RA* с СД типа 1. Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров генов *INS*, *SH2B3*, *PTPN22*, *PTPN11*, *PTPN2* и *CLEC16A* с развитием СД типа 1. Все вышеизложенные результаты получены впервые.

Практическая ценность работы. Показано, что исследованные полиморфные маркеры генов *INS*, *SH2B3*, *PTPN22*, *PTPN11*, *PTPN2* и *CLEC16A* могут использоваться для количественной оценки генетического риска возникновения сахарного диабета типа 1 в популяции русских. Несомненно, что понимание механизма патогенетического развития СД типа 1 со временем позволит создать новые лекарственные средства, предохраняющие от развития этого заболевания у генетически предрасположенных индивидов.

Апробация работы. Диссертационная работа была представлена на заседании Секции молекулярной биологии Ученого Совета ФГУП «ГосНИИ генетика» 2 апреля 2010 г. Результаты настоящей работы докладывались на V-ом съезде Вавиловского общества генетиков и селекционеров, г. Москва (21 – 27 июня, 2009 г.) и на 45-ом ежегодном Конгрессе Европейской ассоциации по изучению диабета, г. Вена, Австрия (20 сентября – 2 октября 2009 г.)

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 4 печатные работы, в том числе 2 статьи.

Структура диссертации. Диссертация состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, описание использованных материалов и методов, результаты и их обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Материалы диссертации изложены на 121

странице машинописного текста и содержат 29 таблиц и 9 рисунков. В работе процитировано 226 зарубежных и 5 отечественных литературных источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Исследование ассоциации полиморфных маркеров ряда генов-кандидатов с сахарным диабетом типа 1.

В работе использовали образцы крови от двух групп: больных СД типа 1 (177 человек) и здоровых индивидов (206 человек) русского происхождения, любезно предоставленных сотрудниками Эндокринологического научного центра Минсоцздрава развития (г. Москва).

Контрольная группа представляла собой случайную выборку пациентов. Выборки были этнически однородны, составлены из русских (на основании паспортных данных), проживающих в г. Москве и не являющихся родственниками (таблица 1). Геномную ДНК пациентов использовали для амплификации фрагментов ДНК, содержащих полиморфные маркеры ряда генов-кандидатов, предположительно вовлеченных в патогенез СД типа 1.

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 и рестриктаз 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.

Таблица 1.

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

Показатель	Группа «СД1+»	Группа «СД1-»
Пол (М/Ж)	95/82	117/89
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

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 HapMap, <http://hapmap.org>).

1.1. Исследование ассоциации полиморфного маркера –23HphI (rs689) гена INS с СД типа 1.

К середине 90-х годов в геноме человека с использованием подхода “ген-кандидат” удалось надежно идентифицировать только два локуса, связанных с предрасположенностью к развитию СД1: локус MHC (главный комплекс гистосовместимости), расположенный на хромосоме 6p21.3, и полиморфный тандемный повтор (VNTR) в 5'-нетранскрибируемой области гена инсулина (INS), расположенного на хромосоме 11p15.5.

В различных популяциях ген INS определяет от 5 до 15% семейного риска развития СД типа 1. Область предрасположенности к СД типа 1 содержит собственно ген INS и полиморфный минисателлит, расположенный в 5'-концевой части этого гена, который обычно называют 5'-VNTR (Bennett et al, 1995).

5'-VNTR гена INS впервые описан в 1981 г. (Bell et al, 1982). Он состоит из тандемно повторяющихся единиц размером 14-15 п.н. Число повторяющихся единиц в составе VNTR может изменяться от 26 до 200 и более. В зависимости от их числа аллели VNTR подразделяют на три класса. Аллели класса I содержат от 26 до 63 повторяющихся единиц, тогда как аллели класса III - от 141 до 209. Промежуточный по длине класс II редко встречается у европейцев, он состоит из аллелей, содержащих около 80 тандемных повторов (Bell et al, 1982).

У индивидов, носителей аллелей класса III, уровень мРНК проинсулина в клетках тимуса в 2-3 раза превышает аналогичные показатели у носителей аллелей класса I (Bennett et al, 1995). Предполагается, что более высокие уровни экспрессии гена INS в тимусе способствуют развитию центральной толерантности, что может объяснять защитную роль этого некодирующего полиморфного маркера. Во многих исследованиях для идентификации аллелей VNTR использовался полиморфный маркер –23HphI (dbSNP rs689) гена INS, который находится в полном неравновесии по сцеплению с VNTR, но, возможно, обладает также и независимым биологическим эффектом. Для русской популяции подобных исследований ассоциации полиморфного маркера –23HphI с СД типа 1 до сих пор не проводилось.

В настоящем исследовании нами была изучена ассоциация полиморфного маркера –23HphI (находится в неравновесии по сцеплению с VNTR-поворотом) гена INS с использованием подхода «случай-контроль» у русских больных с СД типа 1.

Этот полиморфный маркер находится в интроне 1 гена INS в 6 п.н. от 3'-участка сплайсинга первого интрона и расположен в полипиримидиновом тракте, служащим сигналом для сплайсинга 3'-конца интрона 1, который разделяет кодирующий и некодирующий экзоны.

Замена *A* на *T* может влиять на эффективность сплайсинга и приводить к появлению транскриптов с длинным 5'-нетранслируемым участком, что, в свою очередь, скажется на эффективности трансляции мРНК (Kozak, 1988).

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *-23HphI* гена *INS* выявил статистически значимые различия в группе больных сахарным диабетом типа 1 и группе здоровых индивидов. Достоверное увеличение частоты аллеля *A* в группе больных СД типа 1 говорит об ассоциации аллеля *A* и генотипа *AA* ($OR = 2,03$, $p = 4,0 \times 10^{-5}$; $OR = 2,04$, $p = 4,0 \times 10^{-5}$) с повышенным риском развития СД типа 1. В то же время была установлена ассоциация аллеля *T* и генотипа *TT* с пониженным риском развития СД типа 1 ($OR = 0,49$, $p = 4,0 \times 10^{-5}$; $OR = 0,25$, $p = 3,7 \times 10^{-4}$) (таблица 2).

Таблица 2.

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *-23HphI* гена *INS* в группах «СД1+» и «СД1-».

Аллели и генотипы	Частота аллелей и генотипов		Значение χ^2	Уровень значимости p	OR [CI 95%]
	«СД1+» (n = 177)	«СД1-» (n = 206)			
Аллель <i>A</i>	0,816	0,687	16,88	$4,0 \times 10^{-5}$	2,03 [1,44–2,85]
Аллель <i>T</i>	0,184	0,313			0,49 [0,35–0,69]
Генотип <i>AA</i>	0,667	0,495	15,82	$3,7 \times 10^{-4}$	2,04 [1,35–3,09]
Генотип <i>AT</i>	0,299	0,383			0,69 [0,45–1,05]
Генотип <i>TT</i>	0,034	0,121			0,25 [0,10–0,63]

Таким образом, можно сделать вывод, что полиморфный маркер *-23HphI* гена *INS* у русских достоверно ассоциирован с СД типа 1.

1.2. Исследование ассоциации полиморфного маркера *C1858T* (*rs2476601*) гена *PTPN22* с СД типа 1.

Ген *PTPN22*, расположенный в хромосомной области 1p13.3-p13.1, входит в число наиболее значимых генов, предрасполагающих не только к СД типа 1, но и к ревматоидному артриту, системной красной волчанке и ряду других аутоиммунных заболеваний (Lee et al., 2007; Gregersen et al., 2006; Criswell et al., 2005). Тирозиновая фосфатаза лимфоидных клеток (LYP), которая кодируется геном *PTPN22*, – внутриклеточный белок, специфичный для клеток иммунной системы (Cohen et al., 1999). Тирозиновые фосфатазы Т-лимфоцитов осуществляют дефосфорилирование соответствующих белков, передающих сигнал от антигенных рецепторов Т-клеток и рецепторов цитокинов. Они принадлежат к основным негативным регуляторам воспалительных реакций и иммунного ответа (Mustelin et al., 2003). В 2004 г. об-

наружена ассоциация полиморфного маркера *C1858T* гена *PTPN22* с СД типа 1 (Bottini et al., 2004). Однонуклеотидному полиморфизму *C1858T* соответствует аминокислотный полиморфизм *R/W* в положении 620 аминокислотной последовательности тирозиновой фосфатазы Т-лимфоцитов (*R620W*). Предполагают, что функциональная значимость аллеля повышенного риска *620W* связана с тем, что изофермент с остатком триптофана (*W*) в положении 620 имеет на 57% более высокую удельную активность (Vang et al., 2005) и более эффективно ослабляет передачу сигнала внутри Т-клетки.

Вклад полиморфного маркера *C1858T* гена *PTPN22* в формирование предрасположенности к СД типа 1 подтвердился в нескольких геномных анализах с использованием микрочипов высокой плотности (Todd et al., 2007; Hakonarson et al., 2007; Cooper et al., 2008b).

Частоты аллелей полиморфного маркера *C1858T* гена *PTPN22* существенно различаются в разных этнических группах. Так, аллель *T* у монголоидов вообще не обнаружили (Kawasaki et al., 2006), но была найдена ассоциация другого полиморфного маркера *G(-1123)C*, расположенного в промоторной области гена, с классической формой СД типа 1. Многолокусный регрессионный анализ ассоциации с СД типа 1 (Cinek et al., 2007) и ревматоидным артритом (Viken et al., 2007) полиморфных маркеров *C1858T*, *G(-1123)C* и *A2740G* у европейцев показал, что ассоциация двух последних маркеров с заболеваниями обусловлена их неравновесием по сцеплению с *C1858T*.

В нашей работе при исследовании распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *C1858T* гена *PTPN22* в группах «СД1+» и «СД1-» были обнаружены статистически значимые различия (таблица 3).

Таблица 3.

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *C1858T* гена *PTPN22* в группах «СД1+» и «СД1-».

Аллели и генотипы	Частота аллелей и генотипов		Значение χ^2	Уровень значимости p	OR [CI 95%]
	«СД1+» (n = 177)	«СД1-» (n = 206)			
Аллель <i>C</i>	0,816	0,883	6,82	0,0091	0,59 [0,39–0,88]
Аллель <i>T</i>	0,184	0,117			1,77 [1,14–2,55]
Генотип <i>CC</i>	0,667	0,782	6,74	0,034	0,56 [0,35–0,88]
Генотип <i>CT</i>	0,299	0,204			1,67 [1,05–1,66]
Генотип <i>TT</i>	0,034	0,015			2,37 [0,59–9,64]

Достоверное увеличение частоты аллеля *T* ($OR = 1,77$, $p = 0,0091$) и генотипа *CT* ($OR = 1,67$, $p = 0,034$) в группе больных СД типа 1 говорит об их ассоциации с повышенным рис-

ком развития данной патологии (таблица 3). В то же время была установлена ассоциация аллеля *C* и генотипа *CC* с пониженным риском развития СД типа 1 ($OR = 0,59, p = 0,0091$; $OR = 0,56, p = 0,034$). Таким образом, можно сделать вывод, что полиморфный маркер *C1858T* гена *PTPN22* у русских достоверно ассоциирован с СД типа 1.

1.3. Исследование ассоциации полиморфных маркеров *rs2542151*, *rs2847281*, *rs3737361*, *rs547268* и *rs2542156* гена *PTPN2* с СД типа 1.

В 2007 г. проведены широкомасштабные исследования генетической предрасположенности к СД типа 1 в популяции Великобритании (Todd et al., 2007; WTCCC, 2007). Кроме подтверждения ранее найденной ассоциации полиморфного маркера *C1858T* гена *PTPN22*, в этих работах обнаружена ассоциация хромосомной области 12q13, гена *SH2B3*, кодирующего адаптерный белок Lnk, гена *PTPN2*, кодирующего тирозиновую фосфатазу типа 2, а также ряда других локусов, что подтверждено в более поздних публикациях (Cooper et al., 2008a; Barrett et al., 2009).

Тирозиновая фосфатаза PTPN2 (также известна как TC-PTP или PTP-S2) является членом подсемейства 1 (NT1) фосфатаз, чьи функции противоположны функциям тирозиновых киназ (Andersen et al., 2001). Ген *PTPN2* экспрессируется в большинстве типов тканей и его экспрессия зависит от фазы клеточного цикла и регулируется цитокинами (Simonic et al., 2006). PTPN2 имеет две изоформы: главная изоформа TC45, содержащая домен сигнала ядерной локализации и способная перемещаться между цитоплазмой и ядром; и менее распространенная изоформа TC48, находящаяся в эндоплазматическом ретикулуме (Simonic et al., 2006). К настоящему времени идентифицировано множество субстратов для TC45, включая Янус-киназы (Jak), факторы активации транскрипции (STAT), протеинкиназы p42/44, активируемые митогенами (MAPK), внеклеточные сигнальные киназы (ERK) и рецепторы эпидермальных факторов роста (EGFR) (Galic et al., 2003; Wälchli et al., 2000; ten Hoeve et al., 2002). Часть этих сигнальных путей вовлечена как в регуляцию иммунного ответа, так и в развитие β -клеток. В одной из работ (Long et al., 2009) было обнаружено, что Т-лимфоциты $CD4^+$, взятые от здоровых доноров и несущие предрасполагающий к СД типа 1 аллель полиморфного маркера *rs1893217* гена *PTPN2*, замедленно реагируют на интерлейкин 2. Это выражается в уменьшении эффективности фосфорилирования фактора STAT5 и снижении уровня экспрессии гена *FOXP3* в ответ на интерлейкин 2. У больных СД типа 1 наблюдается тот же эффект, но он не зависит от генотипа данного полиморфного маркера, что может объясняться вкладом других предрасполагающих локусов.

В настоящее время для локуса *PTPN2* этиологический вариант, ассоциированный с развитием СД типа 1, не найден, а полиморфные маркеры, обнаруженные в разных исследованиях, не обладают подтвержденной функциональной значимостью. Первым полиморфным

маркером в хромосомной области 18p11, ассоциированным с развитием СД типа 1, был маркер *rs2542151* (WTCCC, 2007). Дальнейшие исследования большого блока неравновесия по сцеплению выявили еще два независимых полиморфизма *rs478582* и *rs1893217*, расположенных в интронах 3 и 7 гена *PTPN2*, соответственно. Определение нуклеотидных последовательностей экзонов и их фланкирующих областей не обнаружило значимых аминокислотных полиморфизмов или мутаций, приводящих к неправильному сплайсингу пре-мРНК гена *PTPN2* (Todd et al., 2007). В дополнение к маркеру *rs2542151* для исследования ассоциации с СД типа 1 нами были выбраны полиморфные маркеры *rs2847281*, *rs3737361*, *rs547268*, характеризующие структуру неравновесия по сцеплению в области гена *PTPN2*, и маркер *rs2542156*, который расположен в предполагаемом участке связывания мРНК hsa-miR-34a и может влиять на уровень синтеза PTPN2.

Таблица 4.

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *rs2847281* гена *PTPN2* в группах «СД1+» и «СД1-».

Аллели и генотипы	Частота аллелей и генотипов		Значение χ^2	Уровень значимости p	OR [CI 95%]
	«СД1+» (n = 177)	«СД1-» (n = 206)			
Аллель <i>C</i>	0,271	0,369	8,31	0,0039	0,64 [0,47–0,87]
Аллель <i>T</i>	0,729	0,631			1,57 [1,15–2,14]
Генотип <i>CC</i>	0,124	0,160	9,78	0,0075	0,74 [0,42–1,33]
Генотип <i>CT</i>	0,294	0,417			0,58 [0,38–0,89]
Генотип <i>TT</i>	0,582	0,422			1,90 [1,27–2,86]

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфных маркеров гена *PTPN2* в группах больных СД типа 1 и здоровых индивидов выявил статистически значимые различия только для маркера *rs2847281* (таблица 4).

Достоверное увеличение частоты аллеля *T* в группе больных СД типа 1 говорит об ассоциации аллеля *T* и генотипа *TT* ($OR = 1,57, p = 0,0039$; $OR = 1,90; p = 0,0075$) с повышенным риском развития данной патологии. В то же время была установлена ассоциация аллеля *C* с пониженным риском развития СД типа 1 ($OR = 0,64, p = 0,0039$). Таким образом, можно сделать вывод, что полиморфный маркер *rs2847281* гена *PTPN2* у русских достоверно ассоциирован с СД типа 1.

Для остальных полиморфных маркеров различий в распределении частот аллелей и генотипов обнаружено не было, что в случае с *rs2542151* может свидетельствовать о недоста-

точном размере выборке или, что более вероятно, о низком уровне ассоциации этого полиморфного маркера с СД типа 1 (таблица 5-8).

Таблица 5.

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *rs2542151* гена *PTPN2* в группах «СД1+» и «СД1-».

Аллели и генотипы	Частота аллелей и генотипов		Уровень значимости p
	«СД1+» (n = 177)	«СД1-» (n = 206)	
Аллель <i>G</i>	0,147	0,129	0,46
Аллель <i>T</i>	0,853	0,871	
Генотип <i>GG</i>	0,023	0,034	0,32
Генотип <i>GT</i>	0,249	0,189	
Генотип <i>TT</i>	0,729	0,777	

Таблица 7.

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *rs547268* гена *PTPN2* в группах «СД1+» и «СД1-».

Аллели и генотипы	Частота аллелей и генотипов		Уровень значимости p
	«СД1+» (n = 177)	«СД1-» (n = 206)	
Аллель <i>A</i>	0,850	0,854	0,87
Аллель <i>C</i>	0,150	0,146	
Генотип <i>AA</i>	0,712	0,718	0,98
Генотип <i>AC</i>	0,277	0,272	
Генотип <i>CC</i>	0,011	0,010	

Маркер *rs2542156* гена *PTPN2*, расположенный в предполагаемом участке связывания миРНК *hsa-miR-34a*, оказался неполиморфным и, следовательно, неинформативным для изучаемой популяции (таблица 8).

1.4. Исследование ассоциации полиморфного маркера *Trp262Arg (rs3184504)* гена *SH2B3* с СД типа 1.

Ген *SH2B3* (хромосомная область 12q24.12) кодирует адаптерный белок Lnk, который, по-видимому, играет важную роль в передаче сигнала от нескольких рецепторов Т-клеток,

Таблица 6.

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *rs3737361* гена *PTPN2* в группах «СД1+» и «СД1-».

Аллели и генотипы	Частота аллелей и генотипов		Уровень значимости p
	«СД1+» (n = 177)	«СД1-» (n = 206)	
Аллель <i>A</i>	0,669	0,675	0,88
Аллель <i>G</i>	0,331	0,325	
Генотип <i>AA</i>	0,395	0,451	0,078
Генотип <i>AG</i>	0,548	0,447	
Генотип <i>GG</i>	0,056	0,102	

Таблица 8.

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *rs2542156* гена *PTPN2* в группах «СД1+» и «СД1-».

Аллели и генотипы	Частота аллелей и генотипов		Уровень значимости p
	«СД1+» (n = 177)	«СД1-» (n = 206)	
Аллель <i>T</i>	1,00	1,00	1,0
Аллель <i>C</i>	0,000	0,000	
Генотип <i>TT</i>	1,00	1,00	1,0
Генотип <i>TC</i>	0,000	0,000	
Генотип <i>CC</i>	0,000	0,000	

что косвенно подтверждается многочисленными исследованиями, обнаружившими ассоциацию этого гена с заболеваниями, в основе которых лежат воспалительные или аутоиммунные реакции – атеросклероз, болезнь Крона и т.п. (Newton-Cheh et al., 2009; Levy et al., 2009; Gudbjartsson et al., 2009; Hunt et al., 2008). Ген *SH2B3* экспрессируется преимущественно в различных типах Т-лимфоцитов (Su et al., 2004).

Белок Lnk состоит из 575 аминокислот и содержит домены SH2 и PH. Домен SH2 отвечает за узнавание и связывание с фосфорилированными тирозиновыми остатками, домен PH (домен гомологии с плекстрином) связывает производные фосфоинозитола и служит для прикрепления белка Lnk к фосфолипидам мембран (Krauss, 2008). Первоначально в хромосомной области 12q24.12 была обнаружена ассоциация маркера *rs17696736*, расположенного в открытой рамке считывания *C12orf30* (WTCCC, 2007). В дальнейшем была обнаружена ассоциация однонуклеотидного полиморфного маркера *T/C (rs3184504)*, расположенного в экзоне 3 гена *SH2B3*, которому соответствует аминокислотный полиморфизм *Trp262Arg* в домене PH белка Lnk (Todd et al., 2007; WTCCC, 2007; Barrett et al., 2009). По видимому, этот полиморфизм является этиологическим вариантом, и мы изучили ассоциацию этого полиморфного маркера с СД типа 1 с использованием подхода «случай-контроль» среди русских г. Москвы.

Таблица 9.

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *rs3184504* гена *SH2B3* в группах «СД1+» и «СД1-».

Аллели и генотипы	Частота аллелей и генотипов		Значение χ^2	Уровень значимости p	OR [CI 95%]
	«СД1+» (n = 177)	«СД1-» (n = 206)			
Аллель <i>C</i>	0,404	0,568	20,42	$6,4 \times 10^{-6}$	0,52 [0,39–0,69]
Аллель <i>T</i>	0,596	0,432			1,94 [1,45–2,58]
Генотип <i>CC</i>	0,185	0,316	20,89	$3,0 \times 10^{-5}$	0,49 [0,31–0,80]
Генотип <i>CT</i>	0,438	0,505			0,77 [0,51–1,14]
Генотип <i>TT</i>	0,376	0,180			2,76 [1,73–4,40]

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *rs3184504* гена *SH2B3* выявил статистически значимые различия в группах больных сахарным диабетом типа 1 и здоровых индивидов. Достоверное увеличение частоты аллеля *T* ($OR = 1,94, p = 6,4 \times 10^{-6}$) и генотипа *TT* ($OR = 2,76, p = 3,0 \times 10^{-6}$) в группе больных СД типа 1 говорит об ассоциации аллеля *T* и генотипа *TT* с повышенным риском развития данной патологии (таблица 9). В то же время установлена ассоциация аллеля *C* и генотипа *CC* с пони-

женным риском развития СД типа 1 ($OR = 0,52, p = 6,4 \times 10^{-6}$; $OR = 0,49, p = 3,0 \times 10^{-5}$). Следует отметить, что исследования ассоциации этого полиморфного маркера с СД типа 1 на европейских выборках показали среднюю степень его влияния на развитие патологии (OR для предрасполагающего аллеля равно 1,25–1,33), что может объясняться или гетерогенностью европейских выборок, или, что более вероятно, неодинаковым вкладом в патогенез заболевания разных генов в различных популяциях.

Таким образом, можно сделать вывод, что полиморфный маркер *rs3184504 (Trp262Arg)* гена *SH2B3* у русских достоверно ассоциирован с СД типа 1.

1.5. Исследование ассоциации полиморфных маркеров *rs17696736, rs12425405, rs11066284, rs7974468* и *rs11066301* гена *PTPN11* с СД типа 1.

Активированные рецепторы эпидермальных факторов роста (EGFR) инициируют каскад процессов фосфорилирования, что позволяет передавать сигналы для различных биологических процессов (Schlessinger, 2002; Hunter, 2000; Pawson et al., 2001). Эти процессы регулируются множеством тирозиновых киназ и тирозиновых фосфатаз. Показано, что одна из этих фосфатаз, SHP-2, также известная как PTPN11, PTP1D, PTP2C, PTP1L, SHPTP3 и Syp (Feng et al., 1993; Freeman et al., 1992; Ahmad et al., 1993), вовлечена в регуляцию сигналов, инициируемых эпидермальными факторами роста и инсулином (Lechleider et al., 1993; Yamauchi et al., 1995). SHP-2 осуществляет дефосфорилирование остатков тирозина рецепторных или адаптерных молекул и, таким образом, регулирует передачу сигнала по сигнальным путям Ras/ERK и PI3-K/Akt, играя важную роль в пролиферации и дифференцировке клеток. SHP-2 кодируется геном *PTPN11* (хромосомная область 12q24.12), широко экспрессируется во всех тканях организма, и содержит два N-концевых SH2-домена, C-концевой каталитический домен и C-концевой сегмент с двумя участками фосфорилирования (Feng, 1999). Недавние исследования показали, что SHP-2 участвует в трансформации фибробластов и гемопоэтических клеток (Nakak et al., 2000; Chen et al., 2007), а мутации в гене *PTPN11* приводят к тяжелым патологиям у новорожденных. Например, ряд мутаций гена *PTPN11* в экзонах, кодирующих один из N-концевых SH2-доменов, вызывает синдром Нунана (Loh et al., 2004), причиной которого являются гематологические аномалии. Таким образом, даже незначительное ослабление функций SHP-2 может приводить к сбоям в путях передачи сигналов от клеточных рецепторов и развитию различных отклонений (Qu, 2002; Qu et al., 1997, 1998, 2001).

Ген *PTPN11* расположен в одном блоке неравновесия по сцеплению с генами *SH2B3, ATXN2* и *TRAFD1*. Наряду с *SH2B3* он является наиболее вероятным геном-кандидатом, продукт которого может принимать участие в развитии СД типа 1. Полиморфный маркер *rs17696736*, для которого показана ассоциация в хромосомной области 12q24.12 (WTCCC,

2007), расположен между генами *SH2B3* и *PTPN11* и вполне вероятно их независимое влияние на возникновение СД типа 1. Для проверки этой гипотезы мы изучили ассоциацию с СД типа 1 полиморфного маркера *rs17696736* и маркеров *rs12425405, rs11066284, rs7974468* и *rs11066301* (характеризуют структуру неравновесия по сцеплению в области гена *PTPN11*).

Исследований по ассоциации гена *PTPN11* с различными заболеваниями почти не проводилось, но недавняя работа Ямшиди и сотр. показала, что два полиморфных маркера этого гена ассоциированы с уровнями аполипротеина В и липопротеинов низкой плотности в плазме (Jamshidi et al., 2007). Это позволило авторам высказать предположение об ассоциации полиморфных маркеров гена *PTPN11* с уровнем активности фосфатазы SHP-2.

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфных маркеров гена *PTPN11* в группах больных СД типа 1 и здоровых индивидов выявил статистически значимые различия в случае полиморфных маркеров *rs17696736* (таблица 10), *rs11066284* (таблица 11) и *rs11066301* (таблица 12).

Таблица 10.

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *rs17696736* гена *PTPN11* в группах «СД1+» и «СД1-».

Аллели и генотипы	Частота аллелей и генотипов		Значение χ^2	Уровень значимости p	OR [CI 95%]
	«СД1+» (n = 177)	«СД1-» (n = 206)			
Аллель A	0,395	0,536	15,18	$9,9 \times 10^{-5}$	0,57 [0,42–0,75]
Аллель G	0,605	0,464			1,77 [1,33–2,36]
Генотип AA	0,226	0,340	12,85	0,0016	0,57 [0,36–0,89]
Генотип AG	0,339	0,393			0,79 [0,52–1,20]
Генотип GG	0,435	0,267			2,11 [1,38–3,24]

Проведенный анализ независимого влияния на развитие патологии всех трех полиморфных маркеров области 12q24.12, ассоциированных с СД типа 1 в нашей работе (многофакторный регрессионный анализ), показал, что ассоциация полиморфных маркеров *rs17696736* и *rs11066301* гена *PTPN11* объясняется тем, что они находятся в неравновесии по сцеплению с полиморфным маркером *Trp262Arg* гена *SH2B3*, а полиморфный маркер *rs11066284* гена *PTPN11*, по-видимому, независимо ассоциирован с развитием СД типа 1, что указывает на возможное существование других этиологических маркеров заболевания в этой области сцепления.

В случае полиморфного маркера *rs11066284* достоверное увеличение частоты аллеля T ($OR = 1,55; p = 0,019$) и генотипа TT ($OR = 1,55; p = 0,013$) в группе больных СД типа 1 гово-

рит об их ассоциации с повышенным риском развития данной патологии (таблица 11). В то же время была установлена ассоциация аллеля *A* с пониженным риском развития СД типа 1 ($OR = 0,64$, $p = 0,019$). Таким образом, можно сделать вывод, что полиморфный маркер *rs11066284* гена *PTPN11* у русских достоверно ассоциирован с СД типа 1.

Таблица 11.

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *rs11066284* гена *PTPN11* в группах «СД1+» и «СД1-».

Аллели и генотипы	Частота аллелей и генотипов		Значение χ^2	Уровень значимости p	OR [CI 95%]
	«СД1+» (n = 177)	«СД1-» (n = 206)			
Аллель <i>T</i>	0,842	0,774	5,54	0,019	1,55 [1,07–2,24]
Аллель <i>A</i>	0,158	0,226			0,64 [0,45–0,93]
Генотип <i>TT</i>	0,684	0,583	8,78	0,013	1,55 [1,02–2,36]
Генотип <i>AT</i>	0,316	0,383			0,74 [0,49–1,14]
Генотип <i>AA</i>	0,000	0,034			0,07 [0,00–1,32]

Таблица 12.

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *rs11066301* гена *PTPN11* в группах «СД1+» и «СД1-».

Аллели и генотипы	Частота аллелей и генотипов		Значение χ^2	Уровень значимости p	OR [CI 95%]
	«СД1+» (n = 177)	«СД1-» (n = 206)			
Аллель <i>A</i>	0,480	0,626	16,46	$5,0 \times 10^{-5}$	0,55 [0,41–0,74]
Аллель <i>G</i>	0,520	0,374			1,81 [1,36–2,42]
Генотип <i>AA</i>	0,232	0,374	17,47	$1,6 \times 10^{-4}$	0,51 [0,32–0,79]
Генотип <i>AG</i>	0,497	0,505			0,97 [0,65–1,45]
Генотип <i>GG</i>	0,271	0,121			2,69 [1,58–4,59]

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфных маркеров *rs12425405* и *rs7974468* гена *PTPN11* в группах больных СД типа 1 и здоровых индивидов не выявил статистически значимых различий (таблица 13-14).

Таким образом, нам удалось показать, что локус *PTPN11* является независимым локусом предрасположенности к СД типа 1 и вклад области 12q24.12 в патогенез заболевания у русских значительно больше, чем в других европейских популяциях.

Таблица 13.

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *rs12425405* гена *PTPN11* в группах «СД1+» и «СД1-».

Аллели и генотипы	Частота аллелей и генотипов		Уровень значимости p
	«СД1+» (n = 177)	«СД1-» (n = 206)	
Аллель <i>C</i>	0,051	0,075	0,17
Аллель <i>G</i>	0,949	0,925	
Генотип <i>CC</i>	0,000	0,005	0,32
Генотип <i>GC</i>	0,102	0,141	
Генотип <i>GG</i>	0,898	0,854	

Таблица 14.

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *rs7974468* гена *PTPN11* в группах «СД1+» и «СД1-».

Аллели и генотипы	Частота аллелей и генотипов		Уровень значимости p
	«СД1+» (n = 177)	«СД1-» (n = 206)	
Аллель <i>G</i>	0,994	0,993	0,78
Аллель <i>A</i>	0,006	0,007	
Генотип <i>GG</i>	0,989	0,985	0,96
Генотип <i>GA</i>	0,011	0,015	
Генотип <i>AA</i>	0,000	0,000	

Известно, что передача сигнала внутрь клетки регулируется по принципу обратной связи и равновесие достигается за счет участия ферментов, относящихся к семейству тирозинных фосфатаз, которые дефосфорилируют соответствующие фосфорилированные белковые факторы (рис. 1). Ассоциация с СД типа 1 установлена для двух генов *PTPN22* и *PTPN2*, относящихся к этому семейству и кодирующих тирозинные фосфатазы лимфоидных клеток (Gregersen et al., 2006), и подтверждена нашим исследованием для популяции русских. Выбранный нами ген *PTPN11*, являющийся наиболее вероятным геном-кандидатом, продукт которого может вносить вклад в развитие СД типа 1, показал наличие независимой ассоциации с заболеванием, но это не исключает существования этиологических вариантов как в других гена кластера *SH2B3-ATXN2-TRAFD1-PTPN11*, так и в представителях всего семейства внутриклеточных тирозинных фосфатаз (*PTPN6* и др.).

На рис. 1 суммированы современные представления о взаимодействии тирозинных киназ, адаптерных белков и тирозинных фосфатаз на примере сигнального каскада Ras/MAP.

1.6. Исследование ассоциации полиморфного маркера *rs2292239* гена *ERBB3* с СД типа 1.

Белок ErbB3 относится к большому семейству трансмембранных рецепторов эпидермальных факторов роста с тирозинкиназной активностью, лигандами которого являются нейрегулин-1 (Nrg1), нейрегулин-2 (Nrg2) и ряд других белков. Эти рецепторы катализируют перенос фосфата с АТФ на гидроксильную группу остатков тирозина определенных белковых факторов и, таким образом, осуществляют передачу сигналов внутрь клетки.

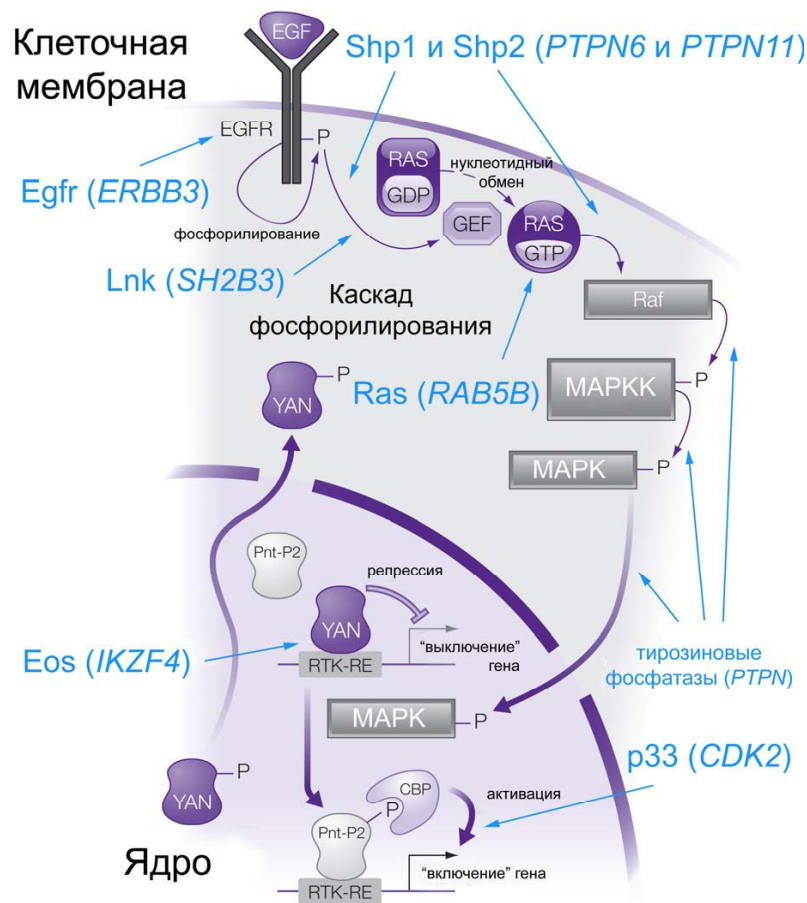


Рис. 1. Схема взаимодействия рецепторных тирозинкиназ, адаптерных белков и тирозинных фосфатаз на примере сигнального каскада Ras/MAP. Стрелками отмечены стадии, протекание которых регулируется продуктами соответствующих генов.

Рецепторы этого типа играют важнейшую роль в большинстве клеточных процессов, таких как метаболизм, пролиферация, дифференциация и апоптоз. В случае ErbB3 процесс взаимодействия рецептора и лиганда вызывает гетеродимеризацию молекул ErbB3 и ErbB2 и активацию киназного домена, запускающего каскад последовательных фосфорилирований через ряд промежуточных белковых факторов (Sh2B1, Sh2B2, Sh2B3 и другие). Ген *ERBB3* (хромосомная локализация 12q13.2) равномерно экспрессируется во всех тканях челове-

ского организма (Su et al, 2004). Однонуклеотидный полиморфизм *A/C* (*rs2292239*) расположен в интроне 7 гена *ERBB3*, данных о его функциональной значимости до сих пор не получено.

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *rs2292239* гена *ERBB3* в группах больных СД типа 1 и здоровых индивидов не выявил статистически значимых различий (таблица 15).

Основная часть работ по изучению ассоциации этого гена с заболеваниями посвящена его роли в онкогенезе, но в последние годы получены данные, указывающие на вовлеченность кластера генов *RAB5B-SUOX-IKZF4-ERBB3-CDK2* (хромосомная локализация 12q13.2) в развитие СД типа 1 (Todd et al., 2007; WTCCC, 2007; Hakonarson et al., 2008; Cooper et al., 2008a; Barrett et al., 2009). Полиморфный маркер *rs2292239* расположен внутри интрона 7 гена *ERBB3* и в других генах этого кластера ряд маркеров находится с ним в полном неравновесии по сцеплению.

Ген *RAB5B* кодирует представителя суперсемейства Ras (Wilson и Wilson, 1992). Ген *IKZF4* кодирует транскрипционный фактор из семейства Eos, который экспрессируется в лимфоцитах и вовлечен в процесс их созревания и развития (Perdomo et al., 2000). Ген *CDK2* кодирует циклин-зависимую киназу 2, обладающую высокой степенью гомологии с белком p34 и участвующую в передаче сигнала пролиферации (Tsai et al., 1991). На рис. 1 приведено схематическое изображение взаимодействия рецепторных тирозинных киназ, адаптерных белков и тирозинных фосфатаз на примере сигнального каскада Ras/MAP.

Таблица 15. Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *rs2292239* гена *ERBB3* в группах «СД1+» и «СД1-».

Аллели и генотипы	Частота аллелей и генотипов		Уровень значимости <i>p</i>
	«СД1+» (n = 177)	«СД1-» (n = 206)	
Аллель <i>A</i>	0,347	0,299	0,14
Аллель <i>C</i>	0,653	0,701	
Генотип <i>AA</i>	0,107	0,068	0,28
Генотип <i>AC</i>	0,480	0,461	
Генотип <i>CC</i>	0,412	0,471	

Схема взаимодействия рецепторных тирозинных киназ, адаптерных белков и тирозинных фосфатаз на примере сигнального каскада Ras/MAP.

Исходя из функциональных ролей генов *RAB5B*, *IKZF4*, *ERBB3* и *CDK2*, можно предположить, что функционально значимый полиморфный маркер может находиться в любом из них и необходимы дальнейшие исследования для обнаружения этиологического маркера СД типа 1 в хромосомной области 12q13.2.

1.7. Исследование ассоциации полиморфных маркеров *rs2903692* и *rs725613* гена *CLEC16A* с СД типа 1.

Ген *K1AA0350* (хромосомная область 16p13.13, новое название *CLEC16A*) является минимально аннотированным геном, который экспрессируется преимущественно в клетках иммунной системы, таких как дендритные клетки, В-лимфоциты и Т-лимфоциты (Su et al.,

2004), и, по-видимому, может быть вовлечен в патогенез СД типа 1. В различных исследованиях была обнаружена ассоциация разных полиморфных маркеров в этой хромосомной области, что объясняется различиями в платформах генотипирования и неодинаковым набором однонуклеотидных полиморфизмов на биочипах разных производителей.

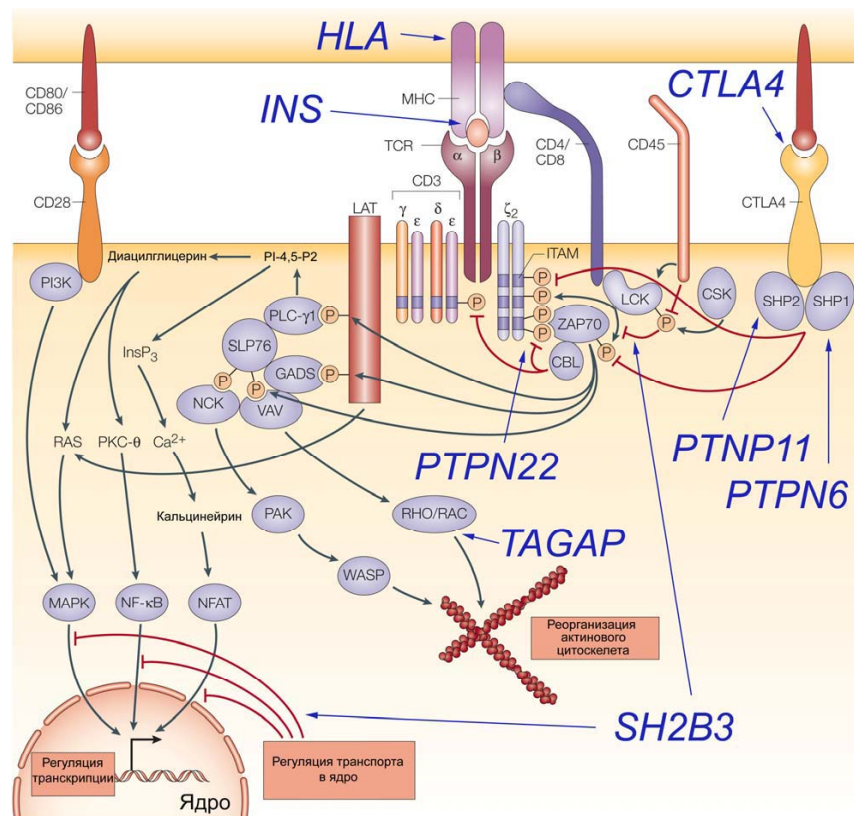


Рис. 2. Схема взаимодействия рецепторных тирозинкиназ, адаптерных белков и тирозинных фосфатаз на примере сигнальных каскадов Т-лимфоцита (Baniyash, 2004). Стрелками отмечены стадии, протекание которых регулируется продуктами соответствующих генов: *HLA* – кодируют белки главного комплекса гистосовместимости; *CTLA4* – кодирует поверхностный рецептор цитотоксических Т-лимфоцитов; *INS* – кодирует проинсулин; *PTPN22*, *PTPN11*, *PTPN6* – кодируют тирозинные фосфатазы Т-лимфоцитов; *SH2B3* – кодирует адаптерный белок Lnk; *TAGAP* – кодирует представителя семейства белков Rho.

Ген *CLEC16A* расположен на расстоянии 20 т.п.н. от гена *CIITA*, кодирующего трансактиватор главного комплекса гистосовместимости класса 2. Ряд исследований посвящен изучению роли гена *CIITA* в аутоиммунных заболеваниях, но противоречивые результаты этих работ и данные новых полногеномных поисков позволяют предположить, что в патогенезе этих заболеваний принимает участие продукт гена *CLEC16A*, а не *CIITA*, который находится с ним в одном блоке сцепления (Skinningsrud et al., 2008; Patarroyo et al., 2002; O'Doherty et al., 2007; Swanberg et al., 2005). О роли этого гена не известно практически ничего. С помощью анализа аминокислотной последовательности продукт этого гена первоначально отнесли к классу лектинов типа С (являются одними из рецепторов дендритных клеток, связывающих гликопротеины), но дальнейшее изучение показало, что из полнофункционального домена связывания углеводов длиной 200 аминокислот в продукте гена *CLEC16A* присутствует лишь 22 аминокислоты и отсутствует участок узнавания углеводных остатков, что не позволяет ему проявлять функциональные свойства лектинов (IMSGC, 2009). При дальнейшем анализе Тодд и сотр. (Todd et al., 2007) обнаружили, что этот белок содержит характерный тирозиновый участок активации иммунорецепторов (ITAM – immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) и, таким образом, может принадлежать к широкому семейству рецепторов лимфоцитов, процесс передачи сигнала которых основан на фосфорилировании и дефосфорилировании тирозиновых остатков клеточными киназами и фосфатазами (рис. 2).

В настоящем исследовании мы изучили ассоциацию полиморфных маркеров *rs2903692* и *rs725613*, которые находятся в неравновесии по сцеплению с полиморфными маркерами, показавшими ассоциацию в других исследованиях (Hakonarson et al., 2007; Awata et al., 2009).

Таблица 16.

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *rs725613* гена *CLEC16A* в группах «СД1+» и «СД1-».

Аллели и генотипы	Частота аллелей и генотипов		Уровень значимости <i>P</i>
	«СД1+» (n = 177)	«СД1-» (n = 206)	
Аллель А	0,621	0,600	0,53
Аллель С	0,379	0,400	
Генотип АА	0,345	0,335	0,59
Генотип АС	0,554	0,529	
Генотип СС	0,102	0,136	

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *rs2903692* гена *CLEC16A* выявил статистически значимые различия в группе больных СД типа 1 и группе здоровых индивидов. Достоверное увеличение частоты аллеля G (*OR* = 1,41; *p* = 0,025) в группе больных СД типа 1 говорит об ассоциации аллеля G

с повышенным риском развития данной патологии (таблица 17). В то же время была установлена ассоциация аллеля *A* и генотипа *AA* ($OR = 0,71, p = 0,025$; $OR = 0,45, p = 0,040$) с пониженным риском развития СД типа 1.

Таблица 17.

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *rs2903692* гена *CLEC16A* в группах «СД1+» и «СД1-».

Аллели и генотипы	Частота аллелей и генотипов		Значение χ^2	Уровень значимости p	OR [CI 95%]
	«СД1+» (n = 177)	«СД1-» (n = 206)			
Аллель <i>A</i>	0,311	0,388	5,03	0,025	0,71 [0,53–0,96]
Аллель <i>G</i>	0,689	0,612			1,41 [1,04–1,90]
Генотип <i>AA</i>	0,085	0,170	6,44	0,040	0,45 [0,24–0,86]
Генотип <i>AG</i>	0,452	0,437			1,06 [0,71–1,59]
Генотип <i>GG</i>	0,463	0,393			1,33 [0,89–2,00]

Таким образом, можно сделать вывод, что полиморфный маркер *rs2903692*, но не маркер *rs725613*, гена *CLEC16A* у русских достоверно ассоциирован с СД типа 1.

1.8. Исследование ассоциации полиморфных маркеров *rs41295061* и *rs11594656* гена *IL2RA* с СД типа 1.

Ген *IL2RA* рассматривался как ген-кандидат на основе исследований ассоциации *IL2* с диабетом на модели мышей линии NOD (Yamanouchi et al., 2007). С помощью подхода tag-SNP была найдена ассоциация хромосомного региона 10p15.1, содержащего гены, кодирующие альфа-цепь рецептора интерлейкина 2 (IL-2R α), альфа-цепь рецептора интерлейкина 15 (IL15-R α) и белок, связывающий РНК (RBM17), с СД типа 1 (Vella et al., 2005), а дальнейшие исследования подтвердили эту ассоциацию (Smyth et al., 2008; Lowe et al., 2007; Qu et al., 2007). После того, как была обнаружена ассоциация с СД типа 1 региона 4q27, содержащего гены *IL2* и *IL21* (Todd et al., 2007; Cooper et al., 2008a), стало ясно, что сигнальный путь IL-2/IL-2R, играющий основную роль в регулировании развития, гомеостаза и функций регуляторных Т-лимфоцитов (Malek, 2008), вносит значительный вклад в развитие аутоиммунных заболеваний. Так, помимо ассоциации с СД типа 1, была обнаружена ассоциация локуса *IL2/IL21* с целиакией (Smyth et al., 2008; Lowe et al., 2007), а локуса *IL2RA* – с ревматоидным артритом (WTCCC, 2007), болезнью Грейвса (Brand et al., 2007) и рассеянным склерозом (Hafler et al., 2007).

Множество сигнальных путей и молекул вовлечены в развитие и функционирование регуляторных Т-лимфоцитов, причем IL-2 является одной из важнейших молекул в этом

процессе. Нарушение функций IL-2, IL-2R α или IL-2R β приводит к тяжелым поражениям органов у мышей в результате воспаления (Willerford et al., 1995; Sadlack et al., 1993; Suzuki et al., 1995), так же как и у людей в случае мутаций в генах, кодирующих субъединицы рецептора интерлейкина 2 (Sharfe et al., 1997). Это происходит не в результате гиперактивации Т-клеток, в которой IL-2 тоже играет важную роль, а из-за резкого снижения количества регуляторных Т-лимфоцитов CD4⁺CD25⁺. В поддержку этой гипотезы свидетельствует тот факт, что инъекция непораженных регуляторных Т-клеток или пересадка здорового костного мозга делает организм животного нечувствительным к данному виду патологии (Krämer et al., 1995; Suzuki et al., 1999; Wolf et al., 2001). Множество исследований доказали необходимость нормального функционирования сигнального пути IL-2/IL-2R для поддержания популяции регуляторных Т-лимфоцитов (Fontenot et al., 2005; D'Cruz and Klein, 2005; Bayer et al., 2005; Liston et al., 2007), которые, несмотря на наличие высокоаффинного рецептора к IL-2, сами не синтезируют этот интерлейкин. Таким образом, развитие и гомеостаз регуляторных Т-клеток зависят от IL-2, который синтезируется другими типами клеток и от уровня экспрессии и/или функциональности рецептора IL-2R. Так как в гене *IL2RA* не было найдено аминокислотных полиморфизмов, по-видимому, этиологическим вариантом будет являться полиморфизм, влияющий на экспрессию гена или синтез белка на уровне мРНК (например, по механизму миРНК).

Таблица 18.

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *rs41295061* гена *IL2RA* в группах «СД1+» и «СД1-».

Аллели и генотипы	Частота аллелей и генотипов		Уровень значимости p
	«СД1+» (n = 177)	«СД1-» (n = 206)	
Аллель <i>A</i>	0,042	0,051	0,58
Аллель <i>C</i>	0,958	0,949	
Генотип <i>AA</i>	0,000	0,000	0,85
Генотип <i>AC</i>	0,085	0,102	
Генотип <i>CC</i>	0,915	0,898	

Таблица 19.

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *rs11594656* гена *IL2RA* в группах «СД1+» и «СД1-».

Аллели и генотипы	Частота аллелей и генотипов		Уровень значимости p
	«СД1+» (n = 177)	«СД1-» (n = 206)	
Аллель <i>T</i>	0,782	0,767	0,61
Аллель <i>A</i>	0,218	0,233	
Генотип <i>TT</i>	0,605	0,578	0,87
Генотип <i>AT</i>	0,356	0,379	
Генотип <i>AA</i>	0,040	0,044	

В нашем исследовании мы изучили полиморфные маркеры *rs41295061* и *rs11594656* гена *IL2RA*, которые показали ассоциацию с СД типа 1 в ряде других популяций (Lowe et al., 2007; Qu et al., 2009; Klinker et al., 2009). Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфных маркеров *rs41295061* и *rs11594656* гена *IL2RA* в группах

больных СД типа 1 и здоровых индивидов не выявил статистически значимых различий (таблица 18-19).

Возможно, это связано малым размером выборки для полиморфных маркеров с низкой частотой минорного аллеля и, следовательно, недостаточной статистической мощностью проведенного исследования для обнаружения ассоциации.

Суммируя полученные нами результаты можно сделать вывод о том, что к развитию СД типа 1 приводит комплекс регуляторных нарушений, вызванных неблагоприятной комбинацией предрасполагающих аллелей в отдельных локусах – *HLA*, *INS*, *CTLA4*, *PTPN22*, *PTPN11*, *PTPN2*, *SH2B3* и др. (таблица 20).

Таблица 20.

Сводная таблица результатов сравнительного анализа частот аллелей исследованных полиморфных маркеров, гены приведены в порядке уменьшения вклада в патогенез СД типа 1.

Ген	Полиморфный маркер – аллель повышенного риска	Уровень значимости <i>p</i> для аллеля повышенного риска	<i>OR</i> [CI 95%] для аллеля повышенного риска
<i>INS</i>	<i>rs689 – A</i>	4,0x10⁻⁵	2,03 [1,44–2,85]
<i>SH2B3</i>	<i>rs3184504 – T</i>	6,4x10⁻⁶	1,94 [1,45–2,58]
<i>PTPN22</i>	<i>rs2476601 – T</i>	0,0091	1,77 [1,14–2,55]
<i>PTPN2</i>	<i>rs2847281 – T</i>	0,0039	1,57 [1,15–2,14]
	<i>rs2542151</i>	0,54	–
	<i>rs3737361</i>	0,88	–
	<i>rs547268</i>	0,87	–
<i>PTPN11</i>	<i>rs2542156</i>	1,00	–
	<i>rs11066284 – T</i>	0,019	1,55 [1,07–2,24]
	<i>rs17696736 – G</i> сцеплен с <i>rs3184504</i>	9,9x10 ⁻⁵	1,77 [1,33–2,36]
	<i>rs12425405</i>	0,17	–
<i>CLEC16A</i>	<i>rs7974468</i>	0,78	–
	<i>rs11066301 – G</i> сцеплен с <i>rs3184504</i>	5,0x10 ⁻⁵	1,81 [1,36–2,42]
	<i>rs2903692 – G</i>	0,025	1,41 [1,04–1,90]
<i>ERBB3</i>	<i>rs725613</i>	0,53	–
	<i>rs2292239</i>	0,14	–
<i>IL2RA</i>	<i>rs41295061</i>	0,58	–
	<i>rs11594656</i>	0,61	–

Полученные данные (значения *OR* и частоты аллелей для полиморфных маркеров) позволяют количественно оценивать генетический риск возникновения сахарного диабета типа 1 в популяции русских. Понимание генетических основ развития заболевания приближает нас к идентификации этиологических мутаций в генах, определяющих предрасположенность к СД типа 1. Несомненно, что понимание механизма патогенетического развития СД типа 1 со временем позволит создать новые лекарственные средства, предохраняющие от развития этого заболевания у генетически предрасположенных индивидов.

ВЫВОДЫ.

1. Определены частоты аллелей и генотипов ряда полиморфных маркеров генов *PTPN2*, *PTPN11*, *PTPN22*, *ERBB3*, *CLEC16A*, *SH2B3*, *INS* и *IL2RA* в группе больных СД типа 1 и группе здоровых индивидов среди русских г. Москвы.
2. Обнаружена ассоциация полиморфного маркера *-23HphI (rs689)* гена *INS* с развитием СД типа 1. Установлено, что носители аллеля *A* данного полиморфного маркера имеют повышенный риск развития СД типа 1, тогда как носители аллеля *T* имеют пониженный риск развития СД типа 1.
3. Обнаружена ассоциация полиморфного маркера *Trp262Arg (rs3184504)* гена *SH2B3* с развитием СД типа 1. Установлено, что носители аллеля *T* данного полиморфного маркера имеют повышенный риск развития СД типа 1, тогда как носители аллеля *C* имеют пониженный риск развития СД типа 1.
4. Обнаружена ассоциация полиморфного маркера *C1858T (rs2476601)* гена *PTPN22* с развитием СД типа 1. Установлено, что носители аллеля *T* данного полиморфного маркера имеют повышенный риск развития СД типа 1, тогда как носители аллеля *C* имеют пониженный риск развития СД типа 1.
5. Обнаружена ассоциация полиморфного маркера *rs2847281* гена *PTPN2* с развитием СД типа 1. Установлено, что носители аллеля *T* данного полиморфного маркера имеют повышенный риск развития СД типа 1, тогда как носители аллеля *C* имеют пониженный риск развития СД типа 1.
6. Обнаружена ассоциация полиморфного маркера *rs11066284* гена *PTPN11* с развитием СД типа 1. Установлено, что носители аллеля *T* данного полиморфного маркера имеют повышенный риск развития СД типа 1, тогда как носители аллеля *A* имеют пониженный риск развития СД типа 1.
7. Обнаружена ассоциация полиморфного маркера *rs2903692* гена *CLEC16A* с развитием СД типа 1. Установлено, что носители аллеля *G* данного полиморфного маркера имеют

повышенный риск развития СД типа 1, тогда как носители аллеля *A* имеют пониженный риск развития СД типа 1.

8. Полученные данные (значения *OR* и частоты аллелей для полиморфных маркеров) позволяют количественно оценивать генетический риск возникновения сахарного диабета типа 1 в популяции русских.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Лаврикова Е.Ю.**, Никитин А.Г., Серегин Ю.А., Зильберман Л.И., Цитлидзе Н.М., Кураева Т.Л., Петеркова В.А., Дедов И.И., Носиков В.В. Ассоциация полиморфного маркера *C1858T* гена *PTPN22* с сахарным диабетом типа 1. *Молекулярная биология*, 2009, **43** (6), 1040-1043.
2. Никитин А.Г., **Лаврикова Е.Ю.**, Серегин Ю.А., Зильберман Л.И., Цитлидзе Н.М., Кураева Т.Л., Петеркова В.А., Дедов И.И., Носиков В.В. Ассоциация полиморфных маркеров генов *SH2B3* и *ERBB3* с сахарным диабетом типа 1. *Молекулярная биология*, 2010, **44** (2), 257-262.
3. Seregin Y.A., **Lavrikova E.Y.**, Nikitin A.G, Zilberman L.I., Kuraeva T.L., Nosikov V.V. Novel polymorphism in the *PTPN2* gene is associated with type 1 diabetes mellitus in Russian patients. Abstracts of the 45th Annual Meeting of European Association for the Study of Diabetes, p. S111 (Abstract 258), Vienna, Austria (September 20 – October 02, 2009). *Diabetologia*, **52** [Suppl. 1], p. S111.
4. Носиков В.В., **Клейменова Е.Ю.** (Лаврикова Е.Ю.), Кураева Т.Л., Никитин А.Г., Зильберман Л.И., Серегин Ю.А., Петеркова В.А., Дедов И.И. Молекулярная генетика сахарного диабета типа 1. *Материалы V Съезда Вавиловского общества генетиков и селекционеров*, 21 – 27 июня, 2009, Москва, 470.