

УДК 577.21:577.2

В.Г. НИГМАТОВА, Г.К. АБУГАЛИЕВА,
Т.Н. МИРОШНИК, Т.С. БАЛМУХАНОВ, Н.А. АЙТХОЖИНА

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФНОГО ВАРИАНТА rs2495636 ГЕНА РЕЦЕПТОРА ИНТЕРЛЕЙКИНА-13 (*IL-13RA1*) С РАССЕЯННЫМ СКЛЕРОЗОМ У РУССКИХ ЖЕНЩИН, ПРОЖИВАЮЩИХ В КАЗАХСТАНЕ

Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина КН МОН РК

Проведено изучение ассоциации полиморфизма 1398 A>G гена IL-13RA1, расположенного на X хромосоме с риском развития рассеянного склероза в казахстанской популяции в двух этнических группах (казахи, русские). Обнаружены статистически достоверные различия в распределении частот аллелей ($\chi^2=10,01$; $P=0,002$) и генотипов ($\chi^2=14,10$; $P=0,001$) между русскими женщинами с клинически диагностированным рассеянным склерозом (РС) и контрольной группой. Распределение генотипов в этих группах соответствовало равновесию Харди-Вайнберга. В казахской этнической группе достоверных различий между пациентами и контролем среди мужчин и женщин не обнаружено. Выявлены статистически значимые межэтнические различия в распределении частот аллелей ($\chi^2=39,22$; $P<0,001$) и генотипов ($\chi^2=40,24$; $P<0,001$) между контрольными группами женщин.

Введение

Автоиммунные заболевания, к которым относится рассеянный склероз (РС), представляют собой тяжелые патологические состояния, причиной которых является дисфункция в работе иммунной системы. РС является хронической нейродегенеративной патологией, пусковой фактор развития которой является предметом обсуждения. Однозначно установлено то, что генетическая составляющая играет ведущую роль по сравнению с ролью внешней среды как фактора риска возникновения РС [1].

Цитокины – небольшие белковые молекулы, которые регулируют межклеточные и межсистемные взаимодействия, определяют выживаемость клеток, стимуляцию или подавление их роста, дифференциацию, функциональную активность и апоптоз, а также обеспечивают согласованность действия иммунной, эндокринной и нервной систем в нормальных условиях и в ответ на патологические воздействия [2]. Интерлейкины относятся к группе цитокинов и взаимодействуют с клетками-мишениями через специфические рецепторы на их поверхности. Интерлейкин 13 (IL-13) является мощным модулятором активности моноцитов, В-клеток и оказывает ингибирующий эффект на продукцию других цитокинов, стимулирующих начало воспалительного процесса [3]. Взаимодействие IL-13 с клетками-мишениями происходит посредством формирования комплекса, в состав которого входит низкоаффинная субъединица рецептора IL-13, обозначаемая как IL-13RA1 и кодируемая геном *IL-13RA1*, расположенным на X хромосоме. Ранее зарубежными исследователями проводился поиск ассоциации полиморфизмов гена *IL-13RA1* с астмой, некоторые из полиморфных сайтов выявили достоверную связь с развитием заболевания [4, 5]. В нашей предшествующей работе полиморфный сайт 1398 A>G гена *IL-13RA1* показал достоверные различия в распределении аллелей и генотипов между исследованными этническими группами, но не был ассоциирован с развитием рака тела матки (РТМ) у казахов и русских, проживающих в Казахстане [6].

В предлагаемой работе проведен поиск ассоциации полиморфного сайта 1398 A>G гена *IL-13RA1* с развитием РС у представителей двух основных национальностей, проживающих в Казахстане – казахов и русских.

Материалы и методы

В качестве материала исследования использована венозная кровь, полученная от 111 пациентов с диагнозом РС из городов Алматы и Астана. Контрольная группа сформирована из образцов крови от 249 здоровых доноров г. Алматы без клинических проявлений семейного анамнеза по неврологическим заболеваниям. Средний возраст в контрольной группе составлял $40,9\pm6,0$ лет, в группе

пациентов – $40,5 \pm 4,8$ лет. Соотношение мужчин и женщин в казахской этнической группе составляло 1:1, в русской – 1:2 для групп контроля и пациентов, соответственно. ДНК выделяли из крови, используя наборы производства компании «Axygen» (США). Последовательность олигонуклеотидных праймеров к исследуемому участку подбирали при помощи программы Primer-Express, в соответствии данным электронных геномных баз ENSEMBL и NCBI. Тестирование полиморфизма гена *IL-13RA1* осуществляли при помощи использования варианта полимеразой цепной реакции (ПЦР-ПДРФ) – анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. Реакцию амплификации проводили согласно следующему протоколу: первичная денатурация 2 мин – 94°C, 35 циклов по схеме: 40 сек – 95°C, 40 сек – 55°C, 50 сек – 72°C, конечная элонгация в течение 10 мин – 72°C. Использованы праймеры следующих нуклеотидных последовательностей: 5'-GAA AGC CTC TCA GTG ATG GAG-3' (прямой) и 5'-GAG GTG CCT GTT TTT AAA TGG-3' (обратный). После амплификации и рестрикции с использованием рестриктазы *MseI* (аналог *Tru9I*) электрофоретическое разделение продуктов проходило в 8% полиакриламидном геле при силе тока 40 мА в течение 2-3 часов. Достоверность различий оценивали с помощью критерия χ^2 . Рассчитывали отношение шансов – odds ratio (OR) для наблюдаемых аллелей и генотипов. Распределение частот генотипов в исследуемых популяциях проверяли на соответствие уравнению Харди-Вайнберга. Обработку данных проводили при помощи программы Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение

Описания исследований, посвященных описанию полиморфизма гена *IL-13RA1* rs2495636, обозначаемого так же, как 1398 A/G или 1368 A/G различными авторами, сравнительно малочисленны, вероятно, в связи с тем, что он расположен в 3'-нетранслируемой области гена. Однако имеются литературные данные, описывающие наличие ассоциации полиморфных изменений в 3'-нетранслируемых областях других генов и развитием патологического процесса [7].

В результате амплификации фрагмента гена рецептора *IL-13RA1* образуется ампликон длиной 140 п. н. Синтезированный продукт имеет два сайта узнавания рестриктазой *MseI* (*Tru9I*). В результате полной рестрикции образуются и электрофоретически детектируются фрагменты размером 17, 29, 94 п.н., соответствующие генотипу AA. Гомозиготный по аллелю G вариант после рестрикции представлен после электрофоретического разделения двумя фрагментами – 17 и 123 п.н., а гетерозиготный – комбинацией всех приведенных выше фрагментов: 17, 29, 94, 123 п.н.

Ген *IL13-RA1* локализован на X хромосоме, а РС встречается в два раза чаще, у женщин, чем у мужчин. Поэтому мужчины и женщины были поделены на разные группы при генотипировании. В таблице 1 приведены данные по распределению аллелей и генотипов у женщин из русской этнической группы.

Таблица 1. Распределение частот аллелей и генотипов полиморфизма rs 2495636 гена *IL13-RA1* у РС пациентов-женщин из русской этнической группы

Аллели/ генотипы	Частота встречаемости		OR	CI (95%)	χ^2	P
	Пациенты	Контроль				
A	0,755	0,899	0,35	0,18 – 0,68	10,01	0,002
G	0,245	0,101				
AA	0,549	0,833	0,24	0,11 – 0,54	14,10	0,001 (0,003)
AG	0,412	0,131				
GG	0,039	0,036	1,10	0,18 – 6,83		

*В скобках указаны данные, описывающие аддитивную модель наследования

В исследованной выборке женщин отклонения от равновесия Харди-Вайнберга для групп пациентов и контроля не наблюдалось. Так как наследование большинства мультифакторных заболеваний описывается при помощи мультипликативной, общей и аддитивной моделей, мы при использовании всех возможных для наших условий вариантов расчетов получили аналогичные результаты. Распределение частот аллелей различается достоверно между больными РС и контролем, так же как распределение генотипов в той же группе. Значения P указывают на то, что с вероятностью 95% можно утверждать, что наблюдаемые различия статистически достоверны и могут быть использованы для установления клинической значимости полученных нами результатов.

Как указывалось выше, ген *IL13-RA1* располагается на X хромосоме, поэтому мужчины являются гемизиготными по исследуемому аллелю и гомозиготный генотип среди мужчин не может быть представлен. В связи с этим в таблице приведено распределение аллелей для изучаемого полиморфного сайта гена (таблица 2).

Таблица 2. Распределение частот аллелей полиморфизма rs 2495636 гена *IL13-RA1* у мужчин из русской этнической группы

Аллели/ генотипы	Частота встречаемости		OR	CI (95%)	χ^2	P
	Пациенты	Контроль				
A	0,773	0,738	1,21	0,36 – 4,05		
G	0,227	0,262	0,83	0,25 – 2,78	0,09	0,95

Согласно приведенным в таблице результатам, полиморфизм rs 2495636 не ассоциирован с развитием РС среди мужчин русской этнической группы. Аналогичные результаты получены при сравнении распределения аллелей данного полиморфного сайта в выборках мужчин из казахской этнической группы ($\chi^2=0,29$; P=0,59).

У женщин из казахской этнической группы не было обнаружено статистически достоверных ассоциаций полиморфизма с заболеванием (таблица 3), при этом наблюдались существенные межэтнические различия в распределении аллелей и генотипов между казашками и русскими (для аллелей $\chi^2=39,22$; P<0,001; для генотипов $\chi^2=40,24$; P<0,001).

Таблица 3. Распределение частот аллелей и генотипов полиморфизма rs2495636 гена *IL13-RA1* у РС пациентов-женщин из казахской этнической группы

Аллели/ генотипы	Частота встречаемости		OR	CI (95%)	χ^2	P
	Пациенты	Контроль				
A	0,471	0,589	0,62	0,29 – 1,34		
G	0,529	0,411	1,61	0,75 – 3,49		
AA	0,294	0,321	0,88	0,27 – 2,88		
AG	0,353	0,536	0,47	0,15 – 1,46		
GG	0,353	0,143	3,27	0,94 – 11,36		

Исследованный нами полиморфизм располагается в гене *IL-13RA1*, который кодирует низкоафинную субъединицу рецептора IL-13. Посредством образования комплекса IL-4RA/IL-13RA1 происходит взаимодействие IL-13 с клетками-мишениями [8]. При исследовании английской и японской популяций продемонстрирована связь полиморфизма 1365 A/G с повышением уровня иммуноглобулина E (IgE) в плазме крови мужчин-британцев и отсутствие его ассоциации с риском развития астмы [5]. В нашем исследовании показана ассоциация этого сайта с заболеванием РС в этнической группе русских женщин, проживающих в Казахстане. Показатель OR достигает значения 2,88 для носителей рискового аллеля G. Распределение частот аллелей в выборке здоровых русских женщин близко к данным, полученным в рамках проекта НарМар для здоровых представителей населения северной и западной Европы, в котором частота аллеля A составляла 0,872 [9], а распределение аллелей в группе здоровых казашек из нашего исследования имеет близкие значения к азиатским частотам в вышеизданном проекте (частота аллеля A в группе НарМар-НСВ составляла 0,581). Обнаруженные нами и приведенные выше этнические различия в распределении аллелей и генотипов полиморфизма rs 2495636 гена *IL13-RA1* между русскими и казашками укладываются в схему, предполагающую наличие азиатского и европейского типов заболевания РС, что может частично объяснить различия в частоте возникновения РС в разных популяциях.

Между тем, белок IL-13RA1 экспрессируется в гематopoэтических и негематopoэтических клетках, включая базофилы, эозинофилы, В-клетки, фибробласты, эндотелиальные клетки, клетки гладкой мускулатуры и некоторые другие [10]. В результате его опосредованного действия происходит активация сигнальных молекул (сигнального трансдуктора, активатора транскрипции 6, субстратов рецептора инсулина 1 и 2), которые могут перемещаться к ядру и связываться со специфическими мотивами промоторных регионов соответствующих генов (главного комплекса гистосовместимости II, CD23 и IL-4RA) [10].

Известно, что полиморфизмы, расположенные в 3'-нетранслируемой области могут оказывать влияние на эффективность транскрипции. Нетранслируемые области имеют несколько функций в жизненном цикле мРНК, включая регуляцию стабильности мРНК, локализации мРНК и эффективности трансляции. Стабильность мРНК может контролироваться 5'- и/или 3'-областью из-за различной чувствительности к ферментам РНКазам, осуществляющим деградацию РНК и регуляторным белкам, которые убыстряют или замедляют деградацию [11]. Существует также возможность того, что полиморфизм 1398 A/G находится в сцеплении с близко расположенным к нему вариабельным сайтом, который является более значимым в отношении риска развития РС, однако данное предположение нуждается в экспериментальном обосновании.

Результаты данной работы и ранее опубликованные нами результаты [6], описывающие межэтнические различия в распространенности полиморфных вариантов, согласуются с результатами исследований в данном направлении проводимыми в мире и подтверждают необходимость учета данных этногеномики при использовании полиморфных участков генов в качестве молекулярно-генетических маркеров заболевания для предиктивной медицины в разных этнических группах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ebers G.S., Sadovnik A.D., Risch N.J. // Nature.-1995.-V.377.-P.150-151.
2. Фрейдлин И.С. Иммунная система и ее дефекты. <http://medbookaida.ru/books/fold9001/book2032/p1.php>
3. Kelly-Welch A., Hanson E.M., Keegan A.D. Interleukin-13 (IL-13) pathway // Sci STKE.-2005.- Jul.19.-V 293.- P.8.
4. Konstantinidis A.K., Barton S.J., Sayers I. et al. Genetic association studies of interleukin-13 receptor alpha1 subunit gene polymorphisms in asthma and atopy // Eur Respir J. 2007 Jul;30(1):40-7. Epub 2007 Mar 28.
5. Heinzmann A., Mao X.Q., Akaiwa M., et al. Genetic variants of IL-13 signalling and human asthma and atopy // Hum. Mol. Genet.- 2000.- V.9.- P.549-559.
6. Нигматова В.Г., Абугалиева Г.К., Мирошник Т.Н., Балмұханов Т.С., Айтхожина Н.А. Изучение ассоциации полиморфного варианта 1398 A>G гена рецептора интерлейкина (IL-13RA1) с заболеванием рака тела матки в популяции Казахстана // Доклады НАН РК.-2011, в печати.
7. Jiang L., Liang J., Jiang M., et al. Functional polymorphisms in the NBS1 gene and acute lymphoblastic leukemia susceptibility in a Chinese population // Eur J Haematol.-2011.-V.86(3).-P.199-205.
8. Zurawski S., Chomarat P., Djossou O., et al. The primary binding subunit of the human interleukin-4 receptor is also a component of the interleukin-13 receptor // J Biol Chem.-1995.-Jun 9.- V.270(23).-P.13869-13878.
9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>
10. Wills-Karp M. IL-12/IL-13 axis in allergic asthma // J. Allergy Clin. Immunol.- 2001.- V.107.-P.9-18.
11. Kozak M. Comparison of initiation of protein synthesis in prokaryotes, eucaryotes, and organelles // Microbiological Reviews.-1983.-V.47 (1).-P.1-45.

Нигматова В.Г., Әбүғалиева Г.К.,
Мирошник Т.Н., Балмұханов Т.С., Айтқожина Н.Ә.

ҚАЗАҚСТАНДА ТҮРАТЫН ҰЛТЫ ОРЫС ӘЙЕЛДЕРІНДЕГІ ШАШЫРАНДЫ СКЛЕРОЗ АУРУЫНЫҢ ИНТЕРЛЕЙКИН-13 (IL-13RA1) РЕЦЕПТОРЫ ГЕНІ rs2495636 ПОЛИМОРФТЫ ВАРИАНТЫМЕН АССОЦИАЦИЯСЫ

ҚР БФМ FK М.Ә. Айтқожин атындағы Молекулярық биология және биохимия институты

Қазақстан популяциясындағы екі этникалық топтарында (қазақ, орыс) даму қаупі бар шашыранды склероз ауруымен X хромосомасында орналасқан *IL-13RA1* гені 1398 A>G полиморфизмінің ассоциациясына зерттеу жүргізілді. ШС диагнозы қойылған орыс әйелдері және бакылау топтары арасында аллельдердің таралу жиіліктері ($\chi^2=10,01$; $P=0,002$) мен генотиптері ($\chi^2=14,10$; $P=0,001$) бойынша нақты статистикалық айырмашылықтар анықталды. Осы топтардағы генотиптердің таралуы Харди-Вайнберг тепе-тендігіне сәйкес келеді. Қазақ этникалық, зерттелінетін және бакылау тобындағы ерлер мен әйелдердің арасында нақты айырмашылықтар анықталмады. Бакылау тобындағы әйелдердің арасында аллельдердің таралу жиіліктері ($\chi^2=39,22$; $P<0,001$) мен генотиптері ($\chi^2=40,24$; $P<0,001$) бойынша этникааралық нақты айырмашылықтар айқындалды.

Nigmatova V.G., Abugalieva G.K.,
Miroshnik T.N., Balmukhanov T.S., Aitkhozhina N.A.

THE ASSOCIATION OF INTERLEUKIN-13 RECEPTOR *IL-13RA1* GENE'S POLIMORPHIC VARIANT
rs2495636 WITH MULTIPLE SCLEROSIS RUSSIAN WOMEN INHABITING IN KAZAKHSTAN

M.A. Aitkhozhin's Institute of molecular biology and biochemistry

The investigation of multiple sclerosis risk development association of 1398 A>G polymorphism of *IL-13RA1* gene located at X chromosome in two ethnic groups (Kazakhs and Russians) in Kazakhstan population was performed. The statistically significant differences in allele's frequency ($\chi^2=10,01$; $P=0,002$) and genotypes distribution ($\chi^2=14,10$; $P=0,001$) were revealed between Russian women with multiple sclerosis diagnosis and controls. The genotypes distribution in investigated groups was found to be in accordance with Hardy-Weinberg equilibrium. The significant differences were not shown between patients and controls neither in men nor in women in Kazakh ethnic group. The significant ethnic differences of allele's frequency ($\chi^2=39,22$; $P<0,005$) and genotypes distribution ($\chi^2=40,24$; $P<0,005$) were found in women control groups.