Генетический анализ семей с сибсами, больными сахарным диабетом 1 типа

В.В. Носиков, Ю.А. Серегин, Е.В. Титович,
К.В. Савостьянов, Л.И. Зильберман, Д.А. Чистяков,
Т.Л. Кураева, И.И. Дедов

Государственный научный центр РФ "ГосНИИ генетика"
(дир. – член-корр. РАН В.Г.Дебабов)
Государственное учреждение
Эндокринологический научный центр
(дир. – акад. РАМН И.И.Дедов) РАМН, Москва

Сахарный диабет (СД) типа 1 характеризуется прогрессирующим разрушением β-клеток поджелудочной железы. СД типа 1 относится к полигенным заболеваниям. В отличие от моногенных синдромов, сочетающихся с различными нарушениями углеводного обмена, при аутоиммунном СД 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.

Большинство этиологических вариантов широко распространены в популяциях, но наличие у индивида какой-либо этиологической мутации само по себе не приводит к развитию СД 1. Только наличие определенной комбинации этиологических вариантов в генах, предрасполагающих к заболеванию, потенциально может приводить к нарушениям, находящим свое выражение в развитии СД 1. Однако даже такая наследственная отягощенность сама по себе недостаточна для развития СД 1. У генетически предрасположенных индивидов СД 1 развивается только вследствие взаимодействия между не изученными генетическими факторами и факторами внешней среды.

В настоящее время для выявления локусов, содержащих гены, предрасполагающие к СД 1, используется подход, основанный на анализе наследования аллелей полиморфных маркеров в ядерных семьях с двумя сибсами, больными СД 1 (семьи с конкордантными сибсами). Несмотря на трудности при подборе семей, несколько групп исследователей провели изучение сцепления большого числа полиморфных локусов генома человека с СД 1. Дополняющий подход основан на использовании полных семей с дискордантными сибсами.

В первой работе по полному геномному поиску, направленной на выявление локусов, предрасполагающих к развитию СД типа 1, использовалась коллекция из 96 ядерных семей (Великобритания) и панель из 290 высокополиморфных микросателлитных маркеров, более или менее равномерно расположенных на всех хромосомах человека. Это исследование позволило обнаружить в геноме человека 18 локусов возможной предрасположенности к СД типа 1 на разных хромосомах [5]. Параллельно был проведен еще один геномный поиск, при котором удалось найти область сцепления с СД типа 1 на хромосоме 11 [6]. Несколько позже с использованием большего числа семей было проведено 2 полных геномных поиска «второго поколения» [4,9] и один частичный поиск [7], что позволило уточнить положение ряда ранее обнаруженных локусов и выявить дополнительные локусы сцепления с СД типа 1. Данные обо всех потенциальных локусах предрасположенности к СД 1 типа суммированы в табл. 1. Часть из потенциальных локусов сцепления с СД типа 1 была обнаружена только с использованием подхода «ген-кандидат»; к ним относятся локус *IDDM18* (ген *IL12B*) и гены *CD4* и *NOS2*.

Целью настоящего исследования было изучение сцепления с СД типа 1 ряда полиморфных маркеров, расположенных в локусах *IDDM8*, *IDDM9*, *IDDM10* и *IDDM12*, с использованием семей с конкордантными и дискордантными парами сибсов из русской популяции. Эти локусы были избраны потому, что именно для них было показано сильное сцепление с СД типа 1 в семьях из популяций Великобритании и США [4,5,9]. Нами также проведено изучение сцепления области хромосомы 11p13 рядом с геном каталазы (*CAT*) с СД типа 1, для которой ранее была показана ассоциация с СД типа 1 с использованием подхода, основанного на сравнении частот аллелей в группах здоровых индивидов и пациентов с СД типа 1 [2].

Материалы и методы

Обследованы 2 группы ядерных семей среди русских Москвы и Самары с конкордантными (33 семьи) и дискордантными (65 семей) парами сибсов.

Геномную ДНК выделяли из крови экстракцией фенолом и хлороформом после инкубации образцов крови с протеиназой К в 0,1% растворе SDS [8]. Термостабильная ДНК-полимераза получена от фирмы "Ферментас" (Вильнюс, Литва), протеиназа К – от фирмы "Merck" (Германия). Синтез использованных в работе олигонуклеотидных праймеров выполнен ЗАО "Синтол" (Москва).

Последовательности праймеров рассчитывали с использованием программы "Олиго" на основании нуклеотидных последовательностей. ДНК амплифицировали методом ПЦР на термоциклерах PHC-2 ("Techne", Великобритания) и "Терцик" (Россия) в 50 мкл реакционной смеси, содержащей буфер 1, 0.2 мМ каждого dNTP, по 10 пикомолей каждого из праймеров, 100-200 нг геномной ДНК и 1.0 ед. ДНК-полимеразы Taq.

На начальной стадии ПЦР денатурировали ДНК при 94°С в течение 3 мин, на конечной – проводили синтез второй цепи при 72°С в течение 7 мин. В промежутке между данными стадиями осуществляли 25-35 циклов ПЦР в зависимости от маркера и количества исходной ДНК по трехступенчатой программе, включающей денатурацию ДНК (94°С/1 мин), отжиг праймеров в течение 1 мин и синтез второй цепи (72°С/1 мин).

Анализ наследования аллелей полиморфных маркеров в конкордантных и дискордантных семьях проводили с использованием объединенного теста TDT (Transmission Dise-qulibrium Test) [12] и S-TDT (Sib Transmission Dis-equlibrium Test) [11].

Таблица 1

Значения λ_S и MLS, полученные на европейских семьях из Великобритании, для локусов, определяющих генетическую предрасположенность к СД типа 1 [5,9]

Локус	Ген-кандидат	Хромосомная локализация	λ_S	MLS
IDDM1	MHC	6q21.3	2.60	34
IDDM2	INS	11p15.5	1.29	2.8
IDDM3	-	15q26	-	2.5*
IDDM4	LRP5	11q13	1.07	2.5
IDDM5	-	6q25	1.15	4.5*
IDDM6	DCC	18q	1.10	3.2
IDDM7	-	2q31	1.13	1.5
IDDM8	-	6q27	1.17	3.4*
IDDM9	-	3q21-25	1.26	2.4
IDDM10	-	10p11.2	1.56	4.7
IDDM11	-	14q24-q31	-	4.0*
IDDM12	CTLA4	2q33	1.61	3.4*
IDDM13	-	2q33	1.60	3.3*
IDDM15	TNDM	6q21	1.34	4.2*
IDDM17	AIRE1	21q22.3	-	-
IDDM18	IL12B	5q31-q33	-	-
DXS1068	-	Xp11.4-p21.1	-	-
GCK	GCK	7p	-	-
NOS2	NOS2	17q11.2	-	-
CD4	CD4	12p12-pter	-	-

* – значения MLS получены другими исследователями [4, 6-7]; λ_S – уровень семейной ассоциации с СД типа 1 ; для европейских популяций суммарное значение λ_S для всех локусов, определяющих предрасположенность к СД типа 1, равно 15.

Результаты и их обсуждение

Для картирования областей сцепления с СД типа 1 использовали 2 группы семей среди русских Москвы и Самары, с конкордантными (33 семьи) и дискордантными (65 семей) парами сибсов. Анализ сцепления с СД типа 1 в русской популяции был проведен на пяти районах хромосом – 2, 3, 6, 10 и 11.

При анализе сцепления области 2q33 с СД типа 1 использовали 2 полиморфных маркера. Один из них представляет микросателлит (AT)n, который расположен в 3'-нетранслируемой области гена CTLA4 [10]. Другой полиморфный маркер расположен внутри кодирующей области гена *CTLA4* и представляет собой мононуклеотидный полиморфизм в положении 49 экзона 1 (*A49G*), которому соответствует аминокислотный полиморфизм *Thr17Ala*, расположенный в лидерном пептиде антигена *CTLA-4* [10]. В настоящее время ген *CTLA4*, кодирующий один из поверхностных антигенов цитотоксических Т-лимфоцитов, является одним из наиболее вероятных генов-кандидатов, определяющих предрасположенность к СД 1 типа.

Использование как конкордантных, так и дискордантных семей позволило установить, что оба полиморфных маркера гена *CTLA4* сцеплены с СД 1 типа в русской популяции (табл. 2). Величины *MLS*, рассчитанные с использованием конкордантных семей, достигают значений 4.11 в случае маркера *Thr17Ala* и 3.84 – в случае определения полиморфного микросателлита. Величины *Z'*, рассчитанные с использованием дискордантных семей, равны 4.07 и 3.98, соответственно, что позволяет сделать вывод, что данная область хромосомы 2, содержащая локус *IDDM12* и ген *CTLA4*, определяет предрасположенность к СД 1 типа и в русской популяции.

При анализе сцепления локуса *IDDM9* с СД типа 1 использовали 2 полиморфных микросателлита *D3S1769* и *D3S4015*. Данный локус расположен на хромосоме 3 (3q21-q25) и величины *MLS* и *Z'*, рассчитанные с использованием обеих групп семей, приведены в табл. 3. Эти значения находятся в интервале 1.73 – 2.19, что позволяет сделать вывод о том, что оба маркера сцеплены с СД типа 1 в русской популяции.

Таблица 2

Значения MLS и Z', полученные с использованием конкордантных и дискордантных семей и двух полиморфных маркеров гена CTLA4, расположенного в локусе IDDM12 на хромосоме 2q33

Полиморфный маркер	Тип полиморфизма	Число аллелей	Конкордантные семьи	Дискордантные семьи		
			MLS	χ^2	Z'	p
Ala17Thr	SNP	2	4.11	15.68	4.07	<0.0001
(AT)n	STR	17	3.84	15.70	3.96	<0.0001

Таблица 3

Значения MLS и Z', полученные с использованием конкордантных и дискордантных семей и двух полиморфных маркеров, расположенных в локусе IDDM9 на хромосоме 3q21-25

Полиморфный маркер	Тип полиморфизма	Число аллелей	Конкордантные семьи	Дискордантные семьи		
			MLS	χ^2	Z'	p
D3S1769	STR	7	1.73	4.36	2.06	0.02
D3S4015	STR	6	1.91	4.91	2.19	0.01

При анализе сцепления с СД типа 1 локуса *IDDM8*, расположеного на хромосоме 6 (6q25-q27), использовали 2 полиморфных маркера: микросателлит *D6S503* и мононуклеотидный полиморфизм *C1183T* в гене *SOD2*, который кодирует супероксиддисмутазу митохондрий, зависимую от ионов Mn^{++}. Полиморфизму *C1183T* соответствует аминокислотный полиморфизм: остатки аланина или валина в положении −9 сигнального пептида — *Ala(−9)Val [3]*. Величины *MLS* и *Z'*, рассчитанные с использованием обеих групп семей для этих маркеров, приведены в табл. 4. Для одного из двух использованных маркеров *(Ala(−9)Val)* обнаружено сцепление с СД типа 1.

Таблица 4

Значения MLS и Z', полученные с использованием конкордантных и дискордантных семей и трех полиморфных маркеров, расположенных в локусе IDDM8 на хромосоме 6q25-q27

Полиморфный маркер	Тип полиморфизма	Число аллелей	Конкордантные семьи	Дискордантные семьи		
			MLS	χ^2	Z'	p
Ala(-9)Val	SNP	2	2.06	8.70	2.25	0.003
D6S503	STR	4	0.81	3.00	0.93	НД

Для анализа сцепления с СД типа 1 локуса IDDM10, расположенного на хромосоме 10 (10p12.2), использовали 4 полиморфных микросателлита, обозначения которых, а также величины MLS и Z', рассчитанные у обеих групп семей для всех маркеров, приведены в табл. 5. Выраженное сцепление было показано для двух полиморфных маркеров (*D10S1243* и *D10S2326*), расположенных в данной области хромосомы 10.

Для проверки предположения, что ген каталазы *(CAT)* может быть ассоциирован с развитием диабетической нефропатии (ДН) при СД типа 1, нами были разработаны полимофные микросателлиты *D11S907* и *D11S2008*, расположенные рядом с этим геном [1-2]. Однако при анализе ассоциации этих полиморфных микросателлитов с ДН при СД типа 1 с использованием групп случай/контроль мы обнаружили ассоциацию этих полиморфных маркеров не с ДН, а с собственно СД типа 1. В связи с этим нами был разработан полиморфный мононуклеотидный маркер *C1167T*, расположенный внутри кодирующей последовательности гена *CAT*, анализ ассоциации которого подтвердил, что данная область хромосомы 11 ассоциирована с СД типа 1 [2].

Для проверки полученных данных мы использовали полиморфные микросателлиты *D11S2008*, *D11S1392* и *D11S1977*, расположенные рядом с геном *CAT*, и маркер *C1167T* внутри этого гена, а также коллекцию конкордантных и дискордантных семей (табл. 6). Анализ полученных данных показал, что из использованных 4 маркеров 3 полиморфных маркера выраженно сцеплены с СД типа 1 в русской популяции. Наибольшие величины *MLS* и *Z'* получены в случае наличия маркера *D11S2008* и равны соответственно 4.93 и 5.62, что позволяет сделать вывод о сильном сцеплении данной области хромосомы 11p13, расположенной рядом с геном *CAT*, с СД типа 1 в русской популяции.

Выводы

1. Проведено картирование областей сцепления с сахарным диабетом типа 1 на хромосомах 2, 3, 6, 10 и 11 с использованием двух групп семей, собранных среди русских Москвы и Самары, с конкордантными (33 семьи) и дискордантными (65 семей) парами сибсов.

Таблица 5

Значения MLS и Z', полученные с использованием конкордантных и дискордантных семей и четырех полиморфных маркеров, расположенных в локусе IDDM10 на хромосоме 10p11.2

Полиморфный маркер	Тип полиморфизма	Число аллелей	Конкордантные семьи	Дискордантные семьи		
			MLS	χ^2	Z'	p
D10S1243	STR	15	3.20	15.12	3.83	<0.0001
D10S507	STR	6	1.06	2.44	1.49	НД
D10S2326	STR	12	1.62	5.40	2.07	0.02
D10S1426	STR	7	0.97	2.69	1.49	НД

Таблица 6

Значения MLS и Z', полученные с использованием конкордантных и дискордантных семей и четырех полиморфных маркеров, расположенных рядом с геном CAT и внутри него, на хромосоме 11p13

Полиморфный маркер	Тип полиморфизма	Число аллелей	Конкордантные семьи	Дискордантные семьи		
			MLS	χ^2	Z'	p
C1167T	SNP	2	3.50	11.95	3.37	<0.0001
D11S1392	STR	6	3.71	16.13	4.02	<0.0001
D11S1977	STR	5	0.93	3.00	1.44	НД
D11S2008	STR	5	4.93	31.1	5.62	<0.0001

2. Обнаружено, что в русской популяции Москвы и Самары полиморфные маркеры, расположенные в локусах *IDDM8*, *IDDM9*, *IDDM10* и *IDDM12*, сцеплены с СД типа 1.

3. На хромосоме 11p13 обнаружено сильное сцепление трех полиморфных маркеров, расположенных рядом с геном *CAT*, с СД типа 1, что позволяет сделать вывод, что нами обнаружен новый локус сцепления с СД типа 1, для которого предложено обозначение *IDDM16*.

Данное исследование финансировалось Федеральной программой РФ "Сахарный диабет" и подпрограммой "Геном человека" Государственной научно-технической программы РФ.

Литература

1. Туракулов Р.И., Чистяков Д.А., Чугунова Л.А., Шамхалова М.Ш., Шестакова М.В., Носиков В.В., Дебабов В.Г., Дедов И.И. // Проблемы эндокринологии. – 1999. – Т. 45. – С. 13-17.
2. Чистяков Д.А., Савостьянов К.В., Титович Е.В., Воронько О.Е., Кураева Т.Л., Дедов И.И., Носиков В.В. // Сборник отчетов за 2000 год подпрограммы "Геном человека". – 2001. – С. 137-138.
3. Chistyakov D.A., Savost'anov K.V., Zotova E.V., Nosikov V.V. // BMC Medical Genetics. – 2001. – Vol. 2. – N. 4.
4. Concannon P., Gogolin-Ewens K.J., Hinds D.A., et al. // Nat. Genet. – 1998. – Vol. 19. – P. 292-296.
5. Davies, J.L., Kawaguchi, Y., Bennett, S.T., et al. // Nature. – 1994. – Vol. 371. – P. 130-136.
6. Hashimoto L., Habita C., Beressl J.P., et al. // Nature. – 1994. – Vol. 371. – P. 161-164.
7. Luo D.F., Buzzetti R., Rotter J.I., et al. // Hum. Mol. Genet. – 1996. – Vol. 5. – P. 693-698.
8. Mathew C.G.P. // In: Methods of Molecular Biology / Walker J., Ed. vol. 2 / Humana Press. – 1984. – P. 31-34.
9. Mein C.A., Esposito L., Dunn M.G., et al. // Nat. Genet. – 1998. – Vol. 19. –P. 297-300.
10. Nistico L., Buzzetti R., Pritchard L.E., et al. // Hum. Mol. Genet. – 1996. – Vol. 5. – P. 1075-1080.
11. Spielman R.S., Evens W.J. // Am. J. Hum. Genet. – 1998. – Vol. 62. – P. 450-558.
12. Spielman R.S., McGinnis R.E., Evens W.J. // Am. J. Hum. Genet. – 1993. – Vol. 53. – P. 506-516.