

Полиморфные маркеры генов *IL2RA* и *IL2*: популяционные различия в ассоциации с сахарным диабетом

¹Копылова О.И., ²Кураева Т.Л., ¹Лаврикова Е.Ю., ²Титович Е.В., ¹Никитин А.Г., ²Петеркова В.А., ¹Носиков В.В., ²Дедов И.И.

¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва
(директор — член-корр. РАН С.Д. Варфоломеев)
²ФГБУ Эндокринологический научный центр, Москва
(директор — академик РАН и РАМН И.И. Дедов)

Цель. Изучить ассоциацию с сахарным диабетом 1 типа (СД1) аллелей и генотипов полиморфных маркеров rs41295061 и rs11594656 гена *IL2RA*, кодирующего α -цепь рецептора интерлейкина 2 и rs2069762 гена *IL2*, кодирующего интерлейкин-2.

Материалы и методы. В исследование включены группа больных СД1 (451 человек) и группа здоровых индивидов (306 человек) русского происхождения. Определение аллелей и генотипов полиморфных маркеров проводилось с помощью амплификации «в реальном времени».

Результаты. Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфных маркеров rs41295061 и rs11594656 гена *IL2RA* и rs2069762 гена *IL2* в группах больных СД1 и здоровых индивидов не выявил статистически значимых различий, что существенно отличает русских больных от больных из Западной Европы, где исследуемые полиморфные маркеры показывают существенную ассоциацию с СД1.

Заключение. Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов *IL2-RA* и *IL2* выявил популяционные различия в ассоциации с СД1 этих маркеров у русских больных и больных из Западной Европы.

Ключевые слова: сахарный диабет 1 типа, полиморфные маркеры, rs41295061, rs11594656, ген, *IL2RA*, rs2069762, *IL2*

Polymorphic gene markers *ILRA* and *IL2*: population distinctions in association with diabetes mellitus

¹Kopylova O.I., ²Kuraeva T.L., ¹Lavrikova E.Yu., ²Titovich E.V., ¹Nikitin A.G., ²Peterkova V.A., ²Dedov I.I., ¹Nosikov V.V.

¹Institute of Biochemical physics, Moscow

²Endocrinology Research Center, Moscow

Aims. In order to study type 1 diabetes mellitus associations, we conducted a comparative analysis of allele and genotype frequency distribution of polymorphic markers rs41295061 and rs11594656 of *IL2RA* gene, which encodes α -chain of interleukin-2 receptor, - and rs2069762, a marker of *IL2*, gene, encoding interleukin-2.

Materials and methods. Experimental group included 451 patients with type 1 diabetes mellitus (DM); control group consisted of 306 healthy subjects (both groups were represented by ethnic Russians). Alleles and polymorphic markers were identified by real-time amplification method.

Results. A comparative analysis of patients with type 1 DM and healthy control group did not show statistically significant differences from the viewpoint of allele and genotype frequency distribution of polymorphic markers rs41295061, rs11594656 and rs2069762. This makes Russian patients considerably different from European ones where markers in question show substantial association with type 1 DM.

Conclusion. A comparative analysis of allele and genotype frequency distribution of *IL2-RA* and *IL2* genes polymorphic markers showed population differences in association of these markers in Russian and European patients.

Key words: diabetes mellitus type 1, polymorphic markers, rs41295061, rs11594656, gene, *IL2RA*, rs2069762, *IL2*

Сахарный диабет 1 типа (СД1) — широко распространенное, тяжело протекающее заболевание, приводящее к ранней инвалидности и преждевременной смерти больных. Для СД1 характерно аутоиммунное разрушение β -клеток островков Лангерганса поджелудочной железы и последующая полная зависимость больного от введения экзогенного инсулина,

необходимого для регуляции уровня глюкозы в крови. СД1 представляет собой не только медицинскую, но и серьезную социальную проблему [1]. В русской популяции около 0,4% индивидов больны этой формой диабета, а средняя продолжительность жизни у заболевших СД1 в детстве на 20 лет меньше, чем средняя продолжительность жизни в общей популяции.

СД1 относится к полигенным, многофакторным заболеваниям. Генетическая предрасположенность к СД1 связана с наследованием определенных аллелей обычных «здоровых» генов [2]. Иногда эти аллели, которые определяют предрасположенность к СД1 и сцеплены с заболеванием, называют этиологическими мутациями или вариантами.

У генетически предрасположенных индивидов СД1 развивается только вследствие взаимодействия между не изученными до конца генетическими факторами и совсем не известными факторами внешней среды [3]. Отсюда следует, что развитие СД1 может быть предотвращено, или, как минимум, отложено и при этом контролируется внесением определенных изменений в среду, в которой живет индивид, предрасположенный к развитию этого заболевания [4].

Интерлейкин-2 (IL-2) – основной регуляторный цитокин, который синтезируется в Т-лимфоцитах в ответ на их активацию антигеном или лектином [5–6]. Однако полученные недавно данные говорят о том [7–9], что развитие аутоиммунного процесса связано главным образом с резким снижением количества регуляторных Т-лимфоцитов CD4⁺CD25⁺, а не с гиперактивацией Т-клеток, в которой IL-2 тоже играет важную роль. 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 [7–9].

Множество исследований доказали необходимость нормального функционирования сигнального пути IL-2/рецептор IL-2R (IL-2R) для поддержания популяции регуляторных Т-лимфоцитов [10–12], которые, несмотря на наличие высокоаффинного рецептора к IL-2, сами не синтезируют этот интерлейкин. Фактически, FoxP3 (транскрипционный фактор, специфичный для клеток CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) ингибирует экспрессию IL-2. Таким образом, развитие и гомеостаз регуляторных Т-клеток зависят от IL-2, который синтезируется другими типами клеток, и от уровня экспрессии и/или функциональности IL-2R. Так как в гене *IL2RA* (гене, кодирующем α-цепь IL-2R) не было найдено аминокислотных полиморфизмов, по-видимому, этиологический вариант может быть связан с уровнем экспрессии гена или с синтезом белка на уровне мРНК.

Впервые ассоциация гена, кодирующего IL-2, с СД1 была обнаружена на модели мышей линии NOD (non-obese diabetic) [7]. Эти данные были подтверждены в двух полных геномных поисках маркеров, ассоциированных с СД1 у человека [13–14]. Однако это предварительные результаты, и для подтверждения роли гена *IL2* в патогенезе СД1 необходимо более тщательное картирование области максимальной ассоциации.

Действие IL-2 реализуется через его специфический рецептор, IL-2R (CD25). На поверхности большинства клеток, в том числе Т-хелперов, рецептор появляется

в ответ на иммуногенный сигнал и обеспечивает пролиферацию данного типа клеток под действием IL-2. Рецептор представляет собой гетеродимер, который состоит из α- и β-цепей. Ген *IL2RA*, расположенный на хромосоме 10p15, кодирует α-цепь [15]. Она обладает слабой способностью связывать IL-2, которая резко усиливается после димеризации с β-цепью, продуктом гена *IL2RB*.

Эксперименты на животных позволили выявить значимость рецептора CD25 (*IL2R*) [7, 16]. Так, у мышей, из кровотока которых удалены клетки с фенотипом CD4⁺/CD25⁺, развивались специфичные для тех или иных органов аутоиммунные заболевания. Таким образом, CD25 обладает свойствами негативного регулятора аутоиммунных процессов.

Выраженная ассоциация с СД1 локуса *IL15RA-IL2RA-RBM17* на хромосоме 10p15.1 обнаружена в 2005 г. [17] и подтверждена в 2007 г. [18]. Среди шести полиморфных маркеров, высокодостоверно ассоциированных с заболеванием, три находились в 5'-области гена *IL2RA*, а остальные – между генами *IL2RA* и *RBM17*. В следующей работе, выполненной в той же лаборатории [19], было показано, что в гене *IL2RA* и прилегающих областях можно выделить три группы маркеров, каждая из которых независимо ассоциирована с СД1 [19]. Максимальный уровень ассоциации был обнаружен для маркеров *rs41295061* и *rs11594656* гена *IL2RA*, кроме того, авторам удалось показать, что можно выделить 4 гаплотипа региона *IL2RA*, ассоциированных с уровнем экспрессии гена *IL2RA* [19].

В данном исследовании нами изучена ассоциация полиморфных маркеров *rs41295061* и *rs11594656* гена *IL2RA* и полиморфного маркера *rs2069762* гена *IL2*, для которых ранее была обнаружена ассоциация с СД1 в ряде исследований [13, 18, 20].

Материалы и методы

В работе использовали образцы крови от группы больных СД1 (451 человек) и группы здоровых индивидов (306 человек) русского происхождения.

Использовали термостабильную ДНК-полимеразу Taq производства ЗАО «Диалат» (г. Москва). Олигонуклеотидные праймеры синтезированы ЗАО «Евроген» (г. Москва). Флуоресцентные зонды синтезированы ООО «ДНК-Синтез» (г. Москва). Геномную ДНК выделяли из цельной крови больных посредством экстракции фенолом-хлороформом после инкубации образцов крови с протеиназой К в присутствии 0,1% додецилсульфата натрия [21].

Амплификацию полиморфных участков генов *IL* и *IL2RA* проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) «в реальном времени» на термоциклере «ABI 7500 Fast» (Applied Biosystems) в 20 мкл реакционной смеси следующего состава: 70 мМ Трис-НСl, pH 8,8, 16,6 мМ сульфат аммония, 0,01% Твин-20, 2 мМ хлорид магния, 200 нМ каждого dNTP, 500 нМ прай-

меров, 100 нМ зондов, 1,5 ед. Таq ДНК-полимеразы, 50–100 нг геномной ДНК. Условия амплификации фрагмента ДНК: 95°C/2 мин – 1-й цикл; 94°C/10 сек, 54°C/60 – 40 циклов для полиморфизма *rs41295061* гена *IL2-RA*, 95°C/2 мин – 1-й цикл; 94°C/10 сек, 56°C/60–40 циклов для полиморфизма *rs11594656* гена *IL2-RA*, 95°C/2 мин – 1-й цикл; 94°C/10 сек, 56°C/60 – 40 циклов *rs2069762* гена *IL2*. Размер продукта амплификации 112 последовательность нуклеотидов (п.н.) для полиморфизма *rs41295061* гена *IL2-RA*, 166 п.н. для полиморфизма *rs11594656* гена *IL2-RA*, 122 п.н. – *rs2069762* гена *IL2*. Анализ продуктов амплификации проводился методом детекции «по конечной точке» с помощью встроенных средств программного обеспечения версии SDS 1.4.

Статистический анализ распределения частот и генотипов проводили с использованием таблиц сопряженности и критерия хи-квадрат (χ^2). Достоверными считали различия при $p < 0,05$. Вычисления производили с помощью программы «Калькулятор для расчета статистики в исследованиях "случай-контроль"» [22].

Результаты и их обсуждение

Несмотря на то, что ключевые полиморфные маркеры *rs41295061* и *rs11594656* находятся между генами *IL2RA* и *RBM17*, развитие СД1 связывают с геном *IL2RA*, исходя из функций его белкового продукта. Аллель А полиморфного маркера *rs41295061* (А/С) гена *IL2RA*, а следовательно и генотип АА, встречаются среди русских гораздо реже (табл. 1). В случае полиморфного маркера *rs11594656* (А/Т) аллель А и генотип АА также достаточно редко встречаются среди русских (табл. 2). Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов этих полиморфных маркеров в группах больных СД1 и здоровых индивидов не выявил статистически значимых различий (табл. 1, 2).

В случае полиморфного маркера *rs2069762* (А/С) гена *IL2* аллель А и генотип АА являются мажорными (табл. 3). Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *rs2069762* гена *IL2* в группах больных СД1 и здоровых индивидов также не выявил статистически значимых различий (табл. 3).

Данные результаты отличаются от результатов, полученных для популяции западной части Европы [10–11], где исследуемые полиморфные маркеры показывают сильную ассоциацию с СД1. Это, возможно, объясняется спецификой аутоиммунной регуляции Т-лимфоцитов у людей русского происхождения.

Частоты встречаемости генотипов и случаи развития СД1 не показывают определенной зависимости в нашей выборке. Поэтому можно предположить, что в русской популяции преобладают другие механизмы развития СД1 по сравнению с населением западной части Европы.

Несомненно, что сигнальный путь IL-2/IL-2R важен для поддержания уровня регуляторных Т-клеток,

Таблица 1

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

Аллели и генотипы	Частота аллелей и генотипов		Значение χ^2	Уровень значимости p
	"СД1+" (n=177)	Контроль (n=206)		
Аллель А	0,042	0,051	0,31	0,58
Аллель С	0,958	0,949		
Генотип АА	0,000	0,000	0,33	0,85
Генотип АС	0,085	0,102		
Генотип СС	0,915	0,898		

Таблица 2

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

Аллели и генотипы	Частота аллелей и генотипов		Значение χ^2	Уровень значимости p
	"СД1+" (n=177)	Контроль (n=206)		
Аллель Т	0,782	0,767	0,26	0,61
Аллель А	0,218	0,233		
Генотип ТТ	0,605	0,578	0,29	0,87
Генотип АТ	0,356	0,379		
Генотип АА	0,040	0,044		

Таблица 3

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

Аллели и генотипы	Частота аллелей и генотипов		Значение χ^2	Уровень значимости p
	"СД1+" (n=451)	Контроль (n=110)		
Аллель А	0,637	0,595	0,54	0,46
Аллель С	0,362	0,405		
Генотип АА	0,408	0,345	1,12	0,57
Генотип АС	0,459	0,500		
Генотип СС	0,133	0,155		

играющих ключевую роль в развитии СД1. Однако существует множество других генетических факторов, в большей степени определяющих этиологию развития СД1 у людей русского происхождения, например, экспрессия гена *SH2B3* имеет более выраженное влияние на развитие СД1 у русских, чем у людей западноевропейской популяции [23].

Наши результаты выявляют популяционные отличия в частоте аллелей и генотипов, а также в ассоциации полиморфных маркеров СД, влияющих на аутоиммунную регуляцию. Поэтому так важно на ранних стадиях найти наиболее значимые генетические факторы, позволяющие проводить персонализированную терапию.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (государственный контракт 16.512.11.2045) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-01443-а).

Литература

1. Gillespie KM. Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention. *CMAJ*. 2006 Jul 18;175(2):165-170.
2. H.-Q. Q C. Polychronakos. The Genetic Basis of Diabetes, in *Diabetes in Women*, 2009. P 377-413.
3. Foulis AK. The pathology of the endocrine pancreas in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. 2009.
4. Meagher C, Tang Q, Fife BT, Bour-Jordan H, Wu J, Pardoux C, Bi M, Melli K, Bluestone JA. Spontaneous development of a pancreatic exocrine disease in CD28-deficient NOD mice. *J Immunol*. 2008 Jun 15;180(12):7793-7803.
5. Lowenthal JW, Zubler RH, Nabholz M, MacDonald HR. Similarities between interleukin-2 receptor number and affinity on activated B and T lymphocytes. *Nature*. 1985 Jun 20-26;315(6021):669-672.
6. Smith KA. Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science*. 1988 May 27;240(4856):1169-1176.
7. Kr mer S, Schimpl A, H nig T. Immunopathology of interleukin (IL) 2-deficient mice: thymus dependence and suppression by thymus-dependent cells with an intact IL-2 gene. *J Exp Med*. 1995 Dec 1;182(6):1769-1776.
8. Wolf M, Schimpl A, H nig T. Control of T cell hyperactivation in IL-2-deficient mice by CD4(+)CD25(-) and CD4(+)CD25(+) T cells: evidence for two distinct regulatory mechanisms. *Eur J Immunol*. 2001 Jun;31(6):1637-1645.
9. Suzuki H, Zhou YW, Kato M, Mak TW, Nakashima I. Normal regulatory alpha/beta T cells effectively eliminate abnormally activated T cells lacking the interleukin 2 receptor beta in vivo. *J Exp Med*. 1999 Dec 6;190(11):1561-1572.
10. Grinberg-Bleyer Y, Baeyens A, You S, Elhage R, Fourcade G, Gregoire S, Cagnard N, Carpentier W, Tang Q, Bluestone J, Chatenoud L, Klatzmann D, Salomon BL, Piaggio E. IL-2 reverses established type 1 diabetes in NOD mice by a local effect on pancreatic regulatory T cells. *J Exp Med*. 2010 Aug 30;207(9):1871-1878. Epub 2010 Aug 2.
11. Alcina A, Fedetz M, Ndagire D, Fernandez O, Leyva L, Guerrero M, Abad-Grau MM, Arnal C, Delgado C, Lucas M, Izquierdo G, Matesanz F. IL2RA/CD25 gene polymorphisms: uneven association with multiple sclerosis (MS) and type 1 diabetes (T1D). *PLoS One*. 2009;4(1):e4137. Epub 2009 Jan 6.
12. Almeida AR, Legrand N, Papiernik M, Freitas AA. Homeostasis of peripheral CD4+ T cells: IL-2R alpha and IL-2 shape a population of regulatory cells that controls CD4+ T cell numbers. *J Immunol*. 2002 Nov 1;169(9):4850-4860.
13. Donnelly P. Progress and challenges in genome-wide association studies in humans. *Nature*. 2008 Dec 11;456(7223):728-731.
14. Todd JA, Walker NM, Cooper JD, Smyth DJ, Downes K, Plagnol V, Bailey R, Nejentsev S, Field SF, Payne F, Lowe CE, Szeszko JS, Hafler JP, Zeitels L, Yang JH, Vella A, Nutland S, Stevens HE, Schuilenburg H, Coleman G, Maisuria M, Meadows W, Smink LJ, Healy B, Burren OS, Lam AA, Ovington NR, Allen J, Adlem E, Leung HT, Wallace C, Howson JM, Guja C, Ionescu-T rgovi te C; Genetics of Type 1 Diabetes in Finland, Simmonds MJ, Heward JM, Gough SC; Wellcome Trust Case Control Consortium, Dunger DB, Wicker LS, Clayton DG. Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. *Nat Genet*. 2007 Jul;39(7):857-864. Epub 2007 Jun 6.
15. Leonard WJ, Depper JM, Kanehisa M, Kr nke M, Peffer NJ, Svetlik PB, Sullivan M, Greene WC. Structure of the human interleukin-2 receptor gene. *Science*. 1985 Nov 8;230(4726):633-639.
16. Shevach EM. Certified professionals: CD4(+)CD25(+) suppressor T cells. *J Exp Med*. 2001 Jun 4;193(11):F41-46.
17. Vella A, Cooper JD, Lowe CE, Walker N, Nutland S, Widmer B, Jones R, Ring SM, McArdle W, Pembrey ME, Strachan DP, Dunger DB, Twells RC, Clayton DG, Todd JA. Localization of a type 1 diabetes locus in the IL2RA/CD25 region by use of tag single-nucleotide polymorphisms. *Am J Hum Genet*. 2005 May;76(5):773-779. Epub 2005 Mar 17.
18. Lowe CE, Cooper JD, Brusko T, Walker NM, Smyth DJ, Bailey R, Bourget K, Plagnol V, Field S, Atkinson M, Clayton DG, Wicker LS, Todd JA. Large-scale genetic fine mapping and genotype-phenotype associations implicate polymorphism in the IL2RA region in type 1 diabetes. *Nat Genet*. 2007 Sep;39(9):1074-1082. Epub 2007 Aug 5.
19. Maier LM, Lowe CE, Cooper J, Downes K, Anderson DE, Severson C, Clark PM, Healy B, Walker N, Aubin C, Oksenberg JR, Hauser SL, Compston A, Sawcer S; International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, De Jager PL, Wicker LS, Todd JA, Hafler DA. IL2RA genetic heterogeneity in multiple sclerosis and type 1 diabetes susceptibility and soluble interleukin-2 receptor production. *PLoS Genet*. 2009 Jan;5(1):e1000322. Epub 2009 Jan 2.
20. Cooper JD, Smyth DJ, Smiles AM, Plagnol V, Walker NM, Allen JE, Downes K, Barrett JC, Healy BC, Mychaleckyj JC, Warram JH, Todd JA. Meta-analysis of genome-wide association study data identifies additional type 1 diabetes risk loci. *Nat Genet*. 2008 Dec;40(12):1399-1401. Epub 2008 Nov 2.
21. Johns MB Jr, Paulus-Thomas JE. Purification of human genomic DNA from whole blood using sodium perchlorate in place of phenol. *Anal Biochem*. 1989 Aug 1;180(2):276-278.
22. Никитин А. Калькулятор для расчета статистики в исследованиях „случай-контроль“, 2009. Online. Available: http://test.tapotili.ru/calculator_or.php. Accessed: 21-июл-2009.
23. Никитин АГ, Лаврикова ЕЮ, Серегин ЮА, и др. Ассоциация полиморфных маркеров генов SH2B3 и ERBB3 с сахарным диабетом типа 1. Молекулярная биология. 2010;44 (2): 257-262.

Копылова Ольга Игоревна	аспирант, Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля, Москва E-mail:okopylova@gmail.com
Кураева Тамара Леонидовна	д.м.н., проф., зав. отделением сахарного диабета Института детской эндокринологии, ФГБУ Эндокринологический научный центр, Москва
Лаврикова Елена Юрьевна	к.б.н., ст.н.с., Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля, Москва
Титович Елена Витальевна	к.м.н., вед.н.с. Института детской эндокринологии, ФГБУ Эндокринологический научный центр, Москва
Никитин Алексей Георгиевич	к.б.н., ст.н.с., Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля, Москва
Петеркова Валентина Александровна	член-корр. РАН, директор Института детской эндокринологии, ФГБУ Эндокринологический научный центр, Москва
Носиков Валерий Вячеславович	д.б.н., проф., Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля, Москва
Дедов Иван Иванович	академик РАН и РАН, директор ФГБУ Эндокринологический научный центр, Москва
