

Полиморфизм гена *CTLA4* (49A/G) в русской популяции у больных сахарным диабетом 1 типа и здоровых доноров

Д.Д. Абрамов¹, И.И. Дедов², Д.Ю. Трофимов³, М.Н. Болдырева¹, Т.Л. Кураева², Л.П. Алексеев¹

¹ГНЦ «Институт Иммунологии ФМБА России», Москва

²ФГУ Эндокринологический научный центр Росмедтехнологий, Москва

³ЗАО «НПФ ДНК-Технология», Москва

Сахарный диабет 1 типа (СД 1) – аутоиммунное заболевание, существенная роль в развитии которого принадлежит наследственной предрасположенности. Генетически обусловленная предрасположенность к развитию СД 1 связана в основном с полиморфизмом региона HLA класса II, однако существует целый ряд не относящихся к HLA генов, полиморфизм которых также может быть связан с развитием СД 1. Одним из генов-кандидатов является ген *CTLA4* (cytotoxic T-lymphocyte associated antigen-4, поверхностный антиген цитотоксических Т-лимфоцитов), белковый продукт которого участвует в регуляции активности Т-лимфоцитов и, следовательно, может играть важную роль в развитии аутоиммунных процессов. Ген *CTLA4* расположен на хромосоме 2q33, содержит 4 экзона и три интрона; полиморфизм гена обусловлен, в частности, полиморфизмом одиночного нуклеотида (SNP) +49A/G в первом экзоне (замена аденина на гуанин в 49 позиции последовательности первого экзона, приводящая к замене треонина на аланин в 17 позиции аминокислотной последовательности белка).

При исследовании различных популяций были получены данные, как подтверждающие [1–6], так и не подтверждающие [7–9] ассоциацию СД 1 с полиморфизмом +49 A/G гена *CTLA4*.

В данной статье представлены результаты работы по изучению распространения полиморфизма 49A/G гена *CTLA4* (rs231775) в русской популяции у больных СД 1 и у здоровых доноров.

Материалы и методы исследования

В исследовании использовали коллекции периферической крови детей в возрасте 5–12 лет с диагнозом СД 1 (50 образцов, москвичи) и здоровых доноров крови (71 образец, москвичи).

ДНК выделяли методом Higuchi (1989) с некоторыми модификациями: 0,5 мл крови, взятой на EDTA, смешивали в 1,5 мл микроцентрифужных пробирках с 0,5 мл лизирующего раствора (0,32М сахарозы, 10 мМ Трис-НСl pH 7,5, 5 мМ MgCl₂, 1% Тритона X-100) и центрифугировали в течение 1 мин при 10 000 об./мин. Супернатант удаляли, а осадки клеточных ядер два раза отмывали указанным буфером. Последующий протео-

лиз проводили в 50 мкл буферного раствора (50 мМ KCl, 10 мМ Трис-НСl pH 8,3, 2,5 мМ MgCl₂, 0,45% NP40, 0,45% Твин 20 и 250 мкг/мл протеиназы К) при 37°C в течение 20 мин. Протеиназу К инактивировали кипячением в течение 5 мин в водяной бане. Полученные образцы ДНК сразу использовали для типирования, либо хранили при –20°C. Концентрация ДНК, определяемая по флуоресценции с Hoechst 33258 на ДНК-минифлуориметре (Hoefer, США) составляла в среднем 50–100 мкг/мл.

Для генотипирования по локусам HLA-DRB1, -DQA1, -DQB1 применяли наборы реагентов производства НПФ ДНК-Технология (Москва).

Для детекции однонуклеотидной замены 49 A/G (rs231775) в первом экзоне гена *CTLA4* был применен метод сиквенс-специфических праймеров с определением продуктов амплификации в режиме «реального времени» [10].

Равное количество ДНК, выделенной из каждого образца, вносили в две амплификационные пробирки, содержащие праймер специфичный для аллеля А (пробирка с амплификационной смесью № 1) или аллеля G (пробирка с амплификационной смесью № 2), амплификационные смеси также содержали одинаковый обратный праймер и флуоресцентно-меченый ДНК-зонд.

Учет результатов проводили после окончания реакции амплификации. Результат генотипирования определяли по разнице пороговых циклов (ΔC_t), полученных для амплификационных смесей № 1 и № 2. В случае гетерозиготы ΔC_t была близка к нулю, в случае гомозигот ΔC_t составляла более 5.

Для детекции однонуклеотидной замены 49 A/G (rs231775) в первом экзоне гена *CTLA4* были разработаны и синтезированы следующие праймеры: специфичный для аллеля А (5'-CAA ggCTCA gCT gAA CCT ggC TA –3'); специфичный для аллеля G (5'-CAA ggC TCA gCT gAA CCT ggC Tg –3'); общий праймер (5'-TCA CTg CCC TTg ACT gCT gAA ACA –3'). Также был синтезирован флуоресцентно-меченый ДНК-зонд (FAM-5'-ggA CCT ggC CCT gCA CTC TCC Tg –3'-BHQ1). При разработке дизайна олигонуклеотидов использовались базы данных нуклеотидных последовательностей Gen Bank, dbSNP и программное обеспечение Oligo 6.0.

Полимеразную цепную реакцию проводили в 35 мкл амплификационной смеси, содержащей 5 мкл образца ДНК и следующие компоненты: праймеры, специфичные для различных аллелей (14pM), общий праймер (14pM), флуоресцентно-меченый ДНК-зонд (7 pM); 6 mM каждого dNTP; 84 mM TRIS-HCl (pH 8,6); 21 mM (NH₄)₂SO₄; 3,1 mM – MgCl₂, а также 5 единиц Taq-полимеразы. В целях повышения специфичности реакции применялся восковой «горячий старт».

Амплификацию и детекцию продуктов амплификации проводили с помощью детектирующего амплификатора «ДТ-322» производства «НПФ ДНК-Технология». Температурный режим амплификации был следующим: денатурация при 94°C – 5 сек, отжиг, элонгация и детекция флуоресценции при 60°C – 20 сек (50 циклов).

Сравнение частот аллелей и генотипов для исследуемых групп проводилось с использованием точного критерия Фишера с применением поправки Бонферони.

Результаты и их обсуждение

Частота аллеля А для здоровых доноров составила 60%, для больных СД 1 – 43%. Частота аллеля G для здоровых доноров составила 40%, для больных СД 1 – 57%. Различия между группами статистически значимы ($P < 0,01$) (табл. 1).

Частота генотипа AA для здоровых доноров составила 35%, для больных СД 1 – 26%. Частота генотипа AG для здоровых доноров составила 51%, для больных СД 1 – 34%. Частота генотипа GG для здоровых доноров составила 14%, для больных СД 1 – 40% (различия статистически значимы) (табл. 2). Отклонения от равновесия Харди–Вайнберга в исследованных популяциях были незначительны.

Необходимо отметить следующее: ген *CTLA4* был представлен генотипом 49GG у 7 из 10 больных СД 1, не

Таблица 1

Частоты аллелей гена <i>CTLA4</i> в русской популяции (Москва) у больных СД 1 и у здоровых доноров				
Аллель	Здоровые доноры (N=71)		Больные СД 1 (N=50)	
	n	%	n	%
CTLA4 49A	85	60	43	43
CTLA4 49G	57	40	57	57

Таблица 2

Частоты генотипов гена <i>CTLA4</i> в русской популяции (Москва) у больных СД 1 и у здоровых доноров				
Генотип	Здоровые доноры (N=71)		Больные СД 1 (N=50)	
	n	%	n	%
CTLA4 49AA	25	35	13	26
CTLA4 49AG	36	51	17	34
CTLA4 49GG	10	14	20	40

несущих ни одного из «классических» маркерных гаплотипов HLA (DRB1*04-DQA1*301-DQB1*302 и DRB1*17-DQA1*501-DQB1*201). В то же время генотип *CTLA4* 49A/G был обнаружен лишь у 6 из 52 здоровых доноров, не несущих ни одного из «классических» маркерных гаплотипов HLA.

В качестве практических рекомендаций можно предложить для формирования в детском возрасте групп «повышенного риска» по развитию СД 1, наряду с изучением полиморфизма HLA класса II, проводить изучение полиморфизма +49A/G гена *CTLA4* (rs231775).

Выводы

Полученные для русской популяции (дети) данные показывают, что гуанин в 49-й позиции нуклеотидной последовательности первого экзона гена *CTLA4* ассоциирован с СД 1.

Литература

1. Krokowski M., Bodalski J., Bratek A., Machejko P., Caillat-Zucman S. CTLA-4 gene polymorphism is associated with predisposition to IDDM in a population from central Poland. // *Diabetes Metab.* 1998.
2. Chistiakov D.A., Savost'yanov K.V., Nosikov V.V. CTLA4 gene polymorphisms are associated with, and linked to, insulin-dependent diabetes mellitus in a Russian population. // *BMC Genet.* 2001.
3. Guja C., Marshall S., Welsh K., Merriman M., Smith A., Todd J.A., Ionescu-Trovanescu C. The study of CTLA-4 and vitamin D receptor polymorphisms in the Romanian type 1 diabetes population. // *J Cell Mol Med.* 2002.
4. Fajardy I., Vambergue A., Stuckens C., Weill J., Danze P.M., Fontaine P. CTLA-4 49 A/G dimorphism and type 1 diabetes susceptibility: a French case-control study and segregation analysis. Evidence of a maternal effect. // *Eur J Immunogenet.* 2002.
5. Mochizuki M., Amemiya S., Kobayashi K., Kobayashi K., Shimura Y., Ishihara T., Nakagomi Y., Onigata K., Tamai S., Kasuga A., Nanazawa S. Association of the CTLA-4 gene 49 A/G polymorphism with type 1 diabetes and autoimmune thyroid disease in Japanese children. *Diabetes Care.* 2003.
6. Kavvoura F.K., Ioannidis J.P. CTLA-4 gene polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes mellitus: a HuGE Review and meta-analysis. // *Am J Epidemiol.* 2005.
7. Yanagawa T., Maruyama T., Gomi K., Taniyama M., Kasuga A., Ozawa Y., Terauchi M., Hirose H., Maruyama H., Saruta T. Lack of association between CTLA-4 gene polymorphism and IDDM in Japanese subjects. // *Autoimmunity.* 1999.
8. Cinek O., Drevnek P., Sumnik Z., Bendlov B., Kolouskov S., Snajderov M., Vavrinec J. The CTLA4 +49 A/G dimorphism is not associated with type 1 diabetes in Czech children. // *Eur J Immunogenet.* 2002.
9. I.I. Dedov, L.I. Kolesnikova, T.P. Bardimova et al. Polymorphism of CTLA4(49 A/G) gene in patients of buryat population with the 1 type diabetes // The 13-th International Congress on circumpolar health: The abstract book, June 12-16, 2006.-Novosibirsk., 2006.-P.63.
10. И.А. Кофиади, Д.В. Ребриков. Методы детекции однонуклеотидных полиморфизмов: аллель-специфическая ПЦР и гибридизация с олигонуклеотидной пробой. // *Генетика*, 2006, том 42, №1, с 22-32.