

УДК 575

Е.В. СНЫТКОВ

преподаватель кафедры общей экологии, биологии
и экологической генетики

Международный государственный экологический институт
им. А.Д. Сахарова БГУ, г. Минск, Республика Беларусь

В.Н. КИПЕНЬ, канд. биол. наук,

научный сотрудник лаборатории генетической и клеточной инженерии
ГНУ Институт генетики и цитологии

Национальной академии наук Беларуси, г. Минск

С.Б. МЕЛЬНОВ, д-р биолог. наук, профессор,

преподаватель кафедры анатомии

Белорусский государственный университет физической культуры,
г. Минск, Республика Беларусь

Статья поступила 4 октября 2018г.

АЛЛЕЛЬНОЕ СООТНОШЕНИЕ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ *ESR1*, *NT5C2* И *PECR*

Резюме. В статье представлен популяционный анализ аллельного состава однонуклеотидных полиморфизмов rs6902771 (ген *ESR1*), rs7590720 (ген *PECR*) и rs11191580 (ген *NT5C2*), а также произведено сравнение аллельных составов белорусской и европейской популяций по вышеозначенным однонуклеотидным полиморфизмам. Изучаемые нами однонуклеотидные полиморфизмы не рассматривались ранее как возможные предикторы развития различных психопатологий, и для работы мы использовали данные крупных исследований генома (GWAS). В разделе «Материалы и методы» дана методика выделения ДНК, состав ПЦР-смеси, протокол амплификации и плавления целевых молекул ДНК, описан алгоритм генотипирования путем анализа кривых плавления. Кроме того, в разделе «Результаты и их обсуждения» проведен литературный анализ вклада вышеозначенных однонуклеотидных полиморфизмов в развитие различных психопатологий.

Ключевые слова: анализ кривых плавления, пероксисомальная транс-2-эноил-КоА редуктаза, 5'-нуклеотидаза, рецептор эстрогена I, психопатология, алкоголизм, шизофрения.

SNYTKOV E.V.

ISEI BSU, Minsk

KIPEN V.N., Cand. of Biolog. Sc.

Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk

MELNOV S.B., Doctor of Biolog. Sc., Professor

Belaruian State University of Physical Culture, Minsk

ALLELIC RATIO OF SINGLE-NUCLEOTIDE POLYMORPHISM OF GENES *ESR1*, *NT5C2* AND *PECR*

Summary. The article presents a population allele frequency analysis for the single-nucleotide polymorphisms rs6902771 (gene *ESR1*), rs7590720 (gene *PECR*) and rs11191580 (gene *NT5C2*) for byelorussian population, as well as a comparison of the allele frequencies for the above mentioned single-nucleotide polymorphisms for different ethnic groups. The single nucleotide polymorphisms that we studied were not previously considered as possible predictors of the development of various psychopathologies, and we used data from genome-wide association study (GWAS) for our work. In the section “Materials and Methods”, the method of DNA extraction, an integral part of PCR mixtures, an amplification protocol and analysis of whole DNA molecules, is given, and an algorithm for genotyping

using the analysis of swimming curves is described. In addition, in the section "Results and Discussion", a literary analysis of the contribution of the above single nucleotide polymorphisms to the development of various psychopathologies was carried out.

Keywords: analysis of melting curves, peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase, 5'-nucleotidase, estrogen receptor 1, psychopathology, alcoholism, schizophrenia.

Введение. Недавние достижения в геномике распространенных психических расстройств и нарушений поведения продемонстрировали, что генетические варианты могут увеличить риск для большого количества диагнозов. Эти результаты вносят вклад в постоянное переосмысление нынешней психиатрической нозологии. Механизмы, лежащие в основе развития психических расстройств и нарушений поведения, часто крайне разнообразны. Спектр этиологических факторов очень широк, начиная от экологических и заканчивая генетическими. В конечном счете, психические заболевания и нарушения поведения являются чрезвычайно распространенными расстройствами, которые оказывают глубокое и продолжительное воздействие на затронутых лиц, их семьи и общество в целом. Из-за их неоднородности, психические заболевания и нарушения поведения создают особые проблемы для классификации и нозологии, которые имеют основополагающее значение при определении групп пациентов для целей, как исследований, так и лечения [1]. Гены, представленные в данной работе, не являются распространенными генами-кандидатами в изучении генетических основ психопатологии и были отобраны авторами при изучении работ, посвященных полногеномному поиску ассоциаций (GWAS) [2], [3].

Ген PEER (Gene ID: 55825) кодирует пероксисомальную транс-2-эноил-КоА редуктазу, которая участвует в пероксисомальном липидном обмене и удлинении жирных кислот. Данный ген оказывает существенное влияние на риск развития алкоголизма. Так, например, было показано, что два однонуклеотидных полиморфных варианта данного гена (rs7590720 и rs1344694), расположенные в 3'-фланкирующей области, тесно связаны с алкоголизмом, реакцией на алкоголь и депрессией [2]. Продукт этого гена участвует в удлинении цепей жирных кислот и является неотъемлемым компонентом пероксисом, которые играют ключевую роль в защите от окислительного стресса, особенно в глиальных клетках. В целом, ассоциация ОНП в гене PEER и алкогольной зависимостью со-

ласуется с находящейся в свободном доступе литературой, демонстрирующей критическую роль пероксисом в опосредовании связанных с алкоголем фенотипов, включая потребление алкоголя и абстиненцию. Логичной гипотезой может быть то, что генетическая изменчивость гена PEER способна изменять фенотип алкогольной зависимости аналогичным образом. Не менее интересен вклад ОНП данного гена в развитие иных психопатологических состояний и зависимостей.

Ген NT5C2 (Gene ID: 22978) кодирует 5'-нуклеотидазу, которая играет важную роль в метаболизме пуринов в клетке, воздействуя прежде всего на 5'-монофосфат инозина и другие пуриновые нуклеотиды. Фермент расположен исключительно в цитоплазматическом матриксе клеток и может играть критическую роль в поддержании постоянного состава внутриклеточных пуриновых/пиримидиновых нуклеотидов. Данный ген, как и ген AS3MT, входит в локус 10q24,32, тесно связанный с шизофренией [4].

Ген ESR1 (Gene ID: 2099) кодирует рецептор эстрогена 1. Белок, кодируемый этим геном, локализуется в ядре, где он может образовывать гомодимер или гетеродимер с рецептором эстрогена 2. Эстроген и его рецепторы необходимы для полового развития и репродуктивной функции, но также играют роль и в других тканях. Рецепторы эстрогена задействованы в таких патологических процессах как рак молочной железы, рак эндометрия и остеопороз. Кроме того, в литературе имеются данные о том что данный ген может оказывать существенное влияние на развитие психических расстройств, различных маний у пациентов с биполярным расстройством, а также на познание и эмоциональный статус [5].

Материалы и методы исследования.

Генотипирование проводилось по трем полиморфным вариантам: rs6902771 (ген ESR1), rs7590720 (ген PEER) и rs11191580 (ген NT5C2). Генотипирование осуществлялось с помощью прибора CFX96 Touch (Bio-Rad). Для моделирования праймеров использовали Primer-Blast NCBI, концентрацию

ДНК определяли с использованием спектрофотометра NanoDrop 1000 (PeqLab, Германия). Забор ДНК проводился с использованием ватных тампон-зондов с последующим выделением генетического материала силикагельным методом по следующему алгоритму:

1) Отрезали ватный участок тампона и помещали в 1,5 мл пробирку;

2) Добавляли 400 мкл буфера для лизиса (T1) (или SLB-буфер) и 15 мкл раствора протеиназы К (концентрация раствора 20 мкг/мл). В зависимости от объема (массы) образца объем лизирующей смеси (лиз. буфер и протеиназа К) может быть пропорционально увеличен;

3) Инкубировали при 56°C при постоянном встряхивании (1000 об/мин.) в течение 1,5-2 ч;

4) Переносили пробирки в термостат (37°C), оставляли на ночь;

5) Центрифугировали при 13000 об/мин. в течение 3 мин.;

6) Отбирали 200 мкл лизата (супернатанта) в новую 1,5 мл пробирку, добавляли 120 мкл BS-буфера (6,3М гуанидингидрохлорид), тщательно перемешивали на вортексе, после чего оставляли на 10 мин. при +4°C;

7) Центрифугировали при 13000 об/мин в течение 3 мин.;

8) Отбирали супернатант в новые пробирки, содержащие 20 мкл SiO₂ (20% р-р), тщательно перемешивали на вортексе, после чего инкубировали при 56 °С при постоянном встряхивании (1000 об/мин) в течение 15-20 мин.;

9) Центрифугировали при 5000 об/мин. в течение 20 сек.;

10) После всего этого необходимо слить переворачиванием пробирки супернатант в

емкость для отработанной жидкости (далее работали с осадком), добавить 600 мкл «Wash Buffer 1», тщательно разбить осадок на вортексе, центрифугировать при 5000 об/мин. в течение 30 сек.;

11) Повторяли п.10 дважды, используя «Wash Buffer 2», после чего отбирали максимально жидкость с помощью дозатора;

12) Подсушивали образцы при 56°C до полного испарения жидкости (не должен чувствоваться запах спирта);

13) Добавляли 40-70 мкл буфера для элюции ДНК, тщательно перемешивали на вортексе, инкубировали при 56°C при постоянном встряхивании (1000 об/мин.) в течение 15-20 мин.;

14) Центрифугировали при 13000 об/мин. в течение 3 мин., супернатант (содержащий ДНК) переносили в новую пробирку.

15) После проделанных действий полученный раствор ДНК можно хранить при -20°C.

Состав ПЦР-смеси на одну реакцию для всех трех пар праймеров представлен в таблице 1, общий объем ПЦР смеси составил 20 мкл.

Генотипирование осуществляли с помощью HRM-анализа. Протокол амплификации и последующего плавления представлен на рисунке 1. Данный протокол подходит для всех трех пар праймеров. Материалом послужил биологический материал людей без каких-либо диагностированных психопатологий. Нормализацию и кластеризацию полученных данных при HRM-анализе проводили при помощи программы PyHRM.

Для амплификации целевых фрагментов ДНК, содержащих ОНП, были использованы праймеры, указанные в таблице 2.

Таблица 1 – Состав ПЦР-смеси в расчете на одну реакцию.

Реагент	Объем, мкл
2x Буффер В	10,0
F-праймер	0,4
R-праймер	0,4
Смесь нуклеотидов	2,0
ДНК-полимераза Tornado	0,1
Краситель EvaGreen	0,3
Вода	4,8
ДНК	2

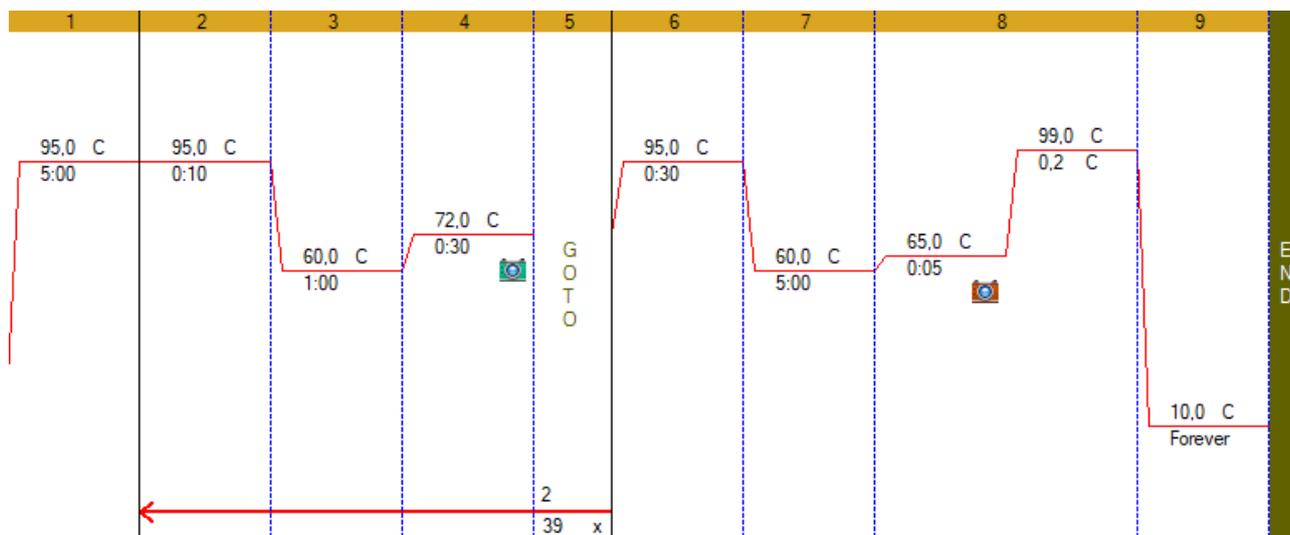


Рисунок 1 – Протокол амплификации и плавления ДНК, прибор CFX96 Touch (Bio-Rad).

Таблица 2 – Последовательности праймеров для анализа полиморфизмов rs6902771 гена ESR1, rs7590720 гена PECR и rs11191580 гена NT5C2

ОНП	Последовательность
rs6902771	5'-AGTGCCATGAAAAACAAGTATAGGG-3'
	5'-CTCCCTCATCAAATCAAGTCCCC-3'
rs7590720	5'-ATCCAAAATAGCCTAGAGATTTGGC-3'
	5'-ATGCTACGTCAAAACTAGCGA-3'
rs11191580	5'-TGTTTTCTTATGGGCTTGC-3'
	5'-TTTGCCCTCTCAAAAAGCAC-3'

Для валидации полученных результатов нами использовался метод полиморфизма длин рестриционных фрагментов (ПДРФ), при котором для ОНП rs6902771 использовалась рестриктаза RsaI, для ОНП rs7590720 - рестриктаза DdeI, и для ОНП rs11191580 - рестриктаза AagI. На рисунке 2 приведен пример работы в программе PyHRM. На графике показано разбиение на кластеры кривых в соответствии с их показателями RFU (интенсивность флуоресценции). На рисунке ниже показано разбиение на кластеры лунок термоблока, в которых находятся образцы.

Результаты и их обсуждение. В ходе исследований нами было прогенотипировано 76 образцов по rs6902771 (ген ESR1), 86 образцов по rs7590720 (ген PECR) и 85 образ-

цов по rs11191580 (ген NT5C2). Аллельный состав исследуемых полиморфизмов суммирован в таблице 3.

В базе данных dbSNP (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP) можно найти аллельный состав изучаемых полиморфизмов в европейской, африканской, восточноазиатской и американской популяциях (проект gnomAD – Genomes). Размер выборки для rs6902771 составил для указанных выборок 18486, 8692, 1614 и 838 человек соответственно; для rs7590720 – 18458, 8708, 1618, 838 человек; для rs11191580 – 1486, 8734, 1614 и 838 человек. Аллельный состав представлен в таблице 4.

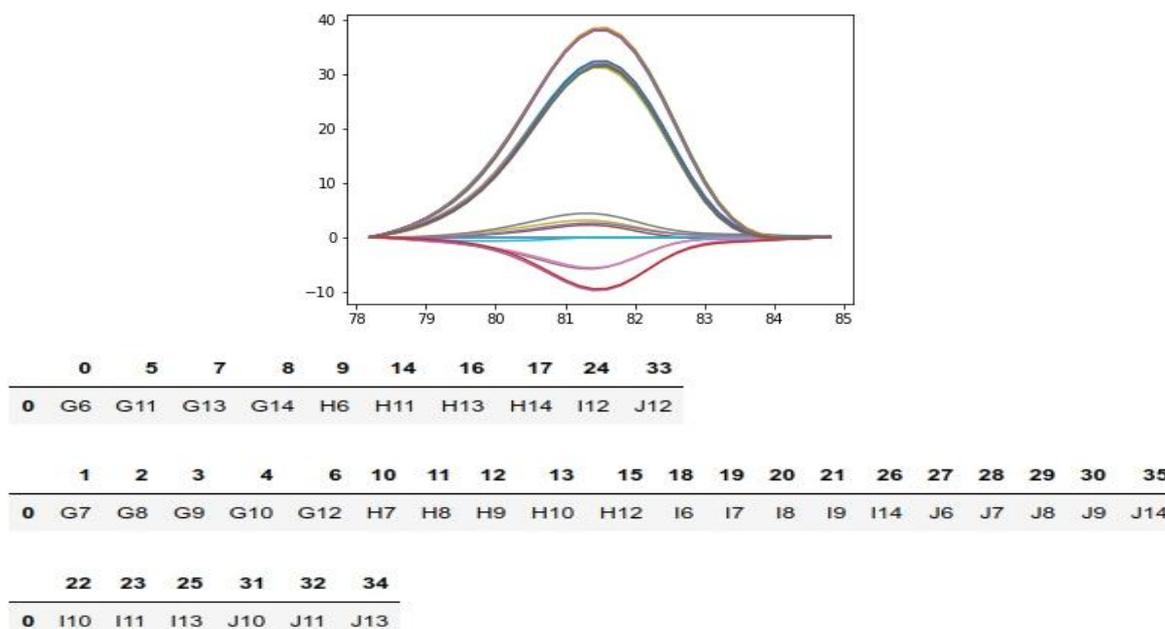


Рисунок 2 – Пример кластеризации кривых плавления с помощью программы PyHRM.

Таблица 3 – Аллельный состав полиморфизмов rs6902771 гена ESR1, rs7590720 гена PECR и rs11191580 гена NT5C2

Генотип	rs6902771	Генотип	rs7590720	Генотип	rs11191580
C/C	15,79%	A/A	89,53%	C/C	5,88%
C/T	69,74%	A/G	5,82%	C/T	14,12%
T/T	14,47%	G/G	4,65%	T/T	80%
Аллель	rs6902771	Аллель	rs7590720	Аллель	rs11191580
C	50,66%	A	92,44%	C	12,94
T	49,34%	G	7,56%	T	87,06

Таблица 4 – Аллельный состав полиморфизмов rs6902771 гена ESR1, rs7590720 гена PECR и rs11191580 гена NT5C2 в других популяциях согласно базе данных dbSNP

Аллель	rs6902771	Аллель	rs7590720	Аллель	rs11191580
Европейская популяция					
C	53,95%	A	70,76%	C	8,85%
T	46,05%	G	29,24%	T	91,15%
Африканская популяция					
C	51,8%	A	77%	C	2%
T	48,2%	G	23%	T	98%
Восточноазиатская популяция					
C	59,9%	A	69,7%	C	28%
T	40,1%	G	30,3%	T	72%
Американская популяция					
C	68%	A	80%	C	17%
T	32%	G	20%	T	83%

К сожалению, в литературе отсутствуют какие-либо данные по генотипическому составу данных полиморфизмов в европейской и других упомянутых выше популяциях, поэтому сравнить по этому критерию обследо-

ванную нами белорусскую и прочие популяции не представляется возможным.

Стоит также отметить, что женщины в европейской популяции, имеющие по крайней мере один аллель T в генотипе по гену ESR1

(Т/Т или же С/Т), имели риск развития болезни Альцгеймера в два раза ниже, чем женщины, не имеющие аллеля Т в соответствующем генотипе [6]. В уже упоминавшейся работе J. Treutlein et al. показали, что аллель G ОНП rs7590720 (ген PЕСR) является аллелем риска для развития алкогольной зависимости у лиц европейской популяции [2]. При изучении ОНП rs11191580 (ген NT5C2) было показано, что основной аллель Т является так же аллелем риска развития шизофрении [3]. Mike A. Nalls et al. также выявили, что аллель Т однонуклеотидного полиморфизма rs11191580 увеличивает риск развития болезни Паркинсона, а уровень значимости на геномном уровне составил $3,98e^{-8}$ [7]. Кроме того, Bergen et al. выявили, что аллель С этого же однонуклеотидного полиморфизма является фактором риска развития шизофрении [8], и этот аллель является фактором риска развития таких патологий, как аутизм, синдром дефицита внимания и гиперактивности, биполярное расстройство, депрессивное расстройство [9].

Заключение. Суммируя изложенное выше можно констатировать, что анализируемые аллели играют существенную роль в предрасположенности к различного рода патологиям нервной системы. В то же время стоит отметить, что при относительной близости данных по европейской и восточноазиатской популяций, американская популяция существенно от них отличается по изучаемым аллелям. При сравнительном анализе полученных нами данных можно констатировать, что значения частот аллелей, характерные для белорусской популяции, отличаются от таковых в европейской, при этом отличие значительно для ОНП гена PЕСR rs7590720 (частота встречаемости аллеля С 92,44% в белорусской популяции и 70,76% в европейской популяции, аллеля G – 7,56% и 29,24% соответственно, $p < 0,05$). В случае с ОНП rs6902771 (ген ESR1) и rs11191580 (ген NT5C2) столь выраженные отличия отмечены не были. Учитывая тот факт, что ген PЕСR принимает участие в формировании алкогольной зависимости, полученные результаты могут быть использованы для оценки уровня риска алкоголизации населения и

формирования общей психической нестабильности как фона для ее проявления.

В целом, полученные нами данные могут послужить основой для дальнейших исследований в области генетики психопатологии и популяционной генетики человека.

Список литературы

1. Kim, Y.S. Recent challenges to the psychiatric diagnostic nosology: a focus on the genetics and genomics of neurodevelopmental disorders. / Y.S. Kim, M.W. State // *Int J Epidemiol.* – 2014. – № 43. – P. 465-475.
2. Treutlein, J. Genome-wide association study of alcohol dependence / J. Treutlein [et al.] // *Arch. Gen. Psychiatry.* – 2009. – № 66. – P. 773-784;
3. Genome-wide association study identifies five new schizophrenia loci / Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study (GWAS) Consortium // *Nat. Genet.* – 2011. – № 18. – P. 969-976;
4. Aberg, K.A. A comprehensive family-based replication study of schizophrenia genes. / K.A. Aberg [et al.] // *JAMA Psychiatry.* – 2013. – № 70. – P. 573-581.
5. Pinsonneault, J.K. Intronic SNP in ESR1 encoding human estrogen receptor alpha is associated with brain ESR1 mRNA isoform expression and behavioral traits / J.K. Pinsonneault [et al.] // *PLoS One.* – 2017. – Vol. 12, №6. P. 1-19.
6. Janicki, S.C. ER α Variants Affect Age at Onset of Alzheimer's Disease in a Multiethnic Female Cohort / S. C. Janicki [et al.] // *Dement Geriatr Cogn Disord.* – 2014, – Vol. 38. – P. 200-213.
7. Nalls, M.A. Genetic comorbidities in Parkinson's disease / M.A. Nalls [et al.] // *Hum Mol Genet.* – 2014. – Vol. 23, № 3. – P. 831-841.
8. Bergen, S.E. Genome-wide association study in a Swedish population yields support for greater CNV and MHC involvement in schizophrenia compared with bipolar disorder / S.E. Bergen [et al.] // *Mol Psychiatry.* – 2012. – Vol. 17, № 9. – P. 880-886.
9. Identification of risk loci with shared effects on five major psychiatric disorders: a genome-wide analysis / Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium // *Lancet.* – 2013. – Vol. 381. – P. 1371-1379.

Received 4 October 2018