Ассоциация хромосомной области 5q31.1-q33.1 (IDDM18) с сахарным диабетом 1 типа среди русского населения г. Москвы

А. Чернышева[1], Л.И. Зильберман[2], К.В. Савостьянов[1], Н.М. Цитлидзе[2], Т.Л. Кураева[2], В.А. Петеркова[2], И.И. Дедов[2], В.В. Носиков[1]

[1]ГНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва,
[2]ФГУ Эндокринологический научный центр Росмедтехнологий, Москва

Сахарный диабет 1 типа (СД1) является одним из наиболее тяжелых наследственных заболеваний человека, приводящим к раннему развитию серьезных осложнений. Нарушения метаболизма глюкозы при СД1 возникают из-за аутоиммунной деструкции β-клеток поджелудочной железы, в результате чего они теряют способность к выработке инсулина. Известно, что СД1 развивается при взаимодействии нескольких генетических компонентов и факторов внешней среды. Полигенная природа СД1 доказана работами по картированию локусов предрасположенности к заболеванию с использованием анализа сцепления в семьях с сибсами. Обнаружено более 20 локусов предрасположенности к СД1 [1–4]. Результаты таких исследований сильно зависят от этнотерриториальной принадлежности выборок больных. К настоящему времени связь с СД1 статистически достоверно доказана только для генов главного комплекса гистосовместимости (MHC), гена инсулина (INS), гена CTLA4 (кодирующего один из поверхностных антигенов Т-лимфоцитов), и гена PTPN22 (кодирующего тирозиновую фосфатазу типа 22 лимфоидных клеток) [5–8].

В 2001 г. Morahan и соавт. идентифицировали еще один локус предрасположенности к СД1, вблизи гена IL12B, кодирующего субъединицу p40 ИЛ-12, в хромосомной области 5q31.1-q33.1 [9]. Данный локус получил обозначение IDDM18.

Белок ИЛ-12 состоит из двух субъединиц, p35 и p40 и является ключевым цитокином, обеспечивающим развитие клеток Th1. Клетки Th1 в свою очередь являются главными медиаторами клеточного иммунитета. Поскольку ИЛ-12 также стимулирует синтез ИФН-γ в клетках киллерах, он играет важную роль и в процессах врожденного, и приобретенного клеточного иммунитета [10].

Для изучения аутоиммунных процессов при СД1, используется линия мышей NOD (non obese diabetic). У мышей этой линии спонтанно развивается СД1, а введение ИЛ-12 ускоряет его развитие. Введение антагониста ИЛ-12 мышам в возрасте до 3 недель приводит к тому, что клетки $CD4^+$ преимущественно дифференцируются в клетки Th2, и это значительно уменьшает вероятность спонтанного развития СД1. Введение антагониста мышам в возрасте 9 недель, когда инсулит уже существует, не влияет на спонтанное развитие СД 1 [10].

Исходя из этих результатов, было высказано предположение, что ген IL12B является геном-кандидатом, определяющим предрасположенность к СД1 и у человека [9]. Авторы исследовали сцепление ряда полиморфных маркеров в области 5q33-q34 данного гена в 422 семьях с двумя и более сибсами, больными СД1 из Австралии и Великобритании. Первоначально полученные результаты свидетельствовали об очень слабой ассоциации данной области с СД1. Однако у сибсов, идентичных по гаплотипам локуса HLA, было выявлено положительное сцепление с СД1, с максимальным значением LOD-балла равным 2,3. Были обнаружены также полиморфные маркеры в 3'-нетранслируемой области гена IL12B (в интроне 4 и в промоторе) и повышенная частота передачи одного из аллелей маркера, расположенного в 3'-нетранслируемой области (полиморфизм C/A в положении 1159 в 3'-UTR области гена IL12B). Однако ассоциации полиморфного маркера C1159A с СД1 в семьях из Норвегии, Швеции, Японии и пяти популяций европейского происхождения выявить не удалось [11–15].

Еще один полиморфный маркер – микросателлит $(ATT)_n$, обозначенный как D5S2941, был обнаружен в работе Davodi-Semiromi и соавт. [16]. Авторы проанализировали ассоциацию маркеров C1159A и D5S2941 с СД1 в 364 семьях европейского происхождения с более чем двумя больными сибсами СД1. Один из аллелей обоих маркеров преимущественно передавался больным сибсам. При изучении ассоциации гаплотипов, была обнаружена значимая ассоциация с СД1 (p=0,02). Использование двух больших коллекций из 337 датских семей с одним больным сибсом и 795 семей европейского и американского происхождения с двумя и более сибсами, больными СД1,

Таблица 1

Последовательности праймеров, условия амплификации и расщепления рестриктазой полиморфных маркеров

Маркер	Праймеры 5′→ 3′	Темп. отжига, °С	Условия ПЦР	Рестриктаза	Длина продукта, п.н.
D5S2060	F ctttaagcccctagtgggag R aacaagagcgaaattccatc	54	$MgCl_2$ 2 мМ	–	106–128
C1159A	F tttggaggaaaagtggaaga R aacattccatacatcctggc	54	$MgCl_2$ 1 мМ	TaqI	323 (185+138)

также не подтвердило ассоциации полиморфного маркера C1159A с СД1 [15]. Ассоциация не была обнаружена и для трех прилежащих к гену IL12B полиморфных маркеров, а также для их гаплотипов [15].

Таким образом, результаты, полученные при анализе сцепления и ассоциации локуса IDDM18, достаточно противоречивы. Эти противоречия могут быть связаны со способностью ИЛ-12 образовывать не только гетеродимеры, но и гомодимеры, конкурирующие с гетеродимерами за связь с рецепторами ИЛ-12, но активирующие рецепторы интерлейкина. Действительно, введение гомодимера ИЛ-12p40 мышам NOD подавляет развитие СД1 [3].

Мы исследовали возможное влияние локуса IDDM18 на предрасположенность к СД1 в семьях из русской популяции. Наличие ассоциации может свидетельствовать либо о прямой связи между данным локусом и наследственной патологией, либо о неравновесии по сцеплению между маркерным локусом и локусом заболевания, если эти локусы расположены достаточно близко друг от друга.

Материалы и методы исследования

Были исследованы ДНК двух групп семей из городских популяций Москвы и Самары, с конкордантными (27 семей) и дискордантными (62 семьи) парами сибсов.

Выделение геномной ДНК из крови больных проводили методом экстракции фенолом-хлороформом после инкубации с протеиназой К в присутствии 0,1% SDS. Генотипы полиморфных маркеров определяли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) (табл. 1). Амплифицированные фрагменты ДНК, содержащие полиморфные маркеры, разделяли в 10% полиакриламидном геле с последующей окраской азотнокислым серебром. Для амплификации использовались праймеры из базы данных GDB [17]. Построение генетической карты хромосомы 5q31.1-q33.1 и поиск полиморфных маркеров осуществлялись на странице Национального центра биоинформатики (NCBI) [18] в сети Интернет.

Фрагменты ДНК, содержащие полиморфные маркеры, амплифицировали с помощью ПЦР и затем инкубировали в течение 2–4 ч с рестриктазой, расщепляющей данный фрагмент в случае наличия в нем аллеля А (см. табл. 1). Визуализация результатов расщепления проводилась электрофоретически в 10% полиакриламидном геле с окраской бромистым этидием.

При исследовании сцепления на семьях с конкордантными сибсами величину LOD рассчитывали исходя из отклонения от расщепления 0,25:0,5:0,25 [19]. Максимальный LOD-балл по всем аллелям (MLS) представляет собой десятичный логарифм отношения вероятностей подтверждения и опровержения гипотезы о сцеплении генетического маркера с заболеванием.

Анализ ассоциации конкордантных и дискордантных семей проводили с использованием объединенного теста TDT (Transmission Disequlibrium Test) [20] и S-TDT (Sib Transmission Disequlibrium Test) [21]. Расчет проводился с помощью компьютерной программы S-TDT [22].

Результаты и их обсуждение

Предыдущие исследования позволили примерно определить область максимального сцепления с СД1 в популяциях Европы, Азии и Северной Америки. Она находится внутри гена IL12B или в непосредственной близости от него.

В настоящем исследовании использовали два полиморфных маркера (табл. 2) в локусе IDDM18, расположенном в хромосомной области 5q31.1-q33.1. Один из выбранных полиморфных маркеров расположен в 3’-нетранслируемой области гена IL12B (C1159A) и является самым часто упоминаемым полиморфным маркером, связанным с локусом IDDM18. Второй маркер, D5S2060, является микросателлитом и расположен в непосредственной близости от маркера C1159A.

Оценка сцепления полиморфных маркеров в области 5q31.1-q33.1 проводилась только на ядерных семьях с конкордантными парами сибсов. Для каждого аллеля вычислялся максимальный LOD-балл (MLS), характеризующий вероятность совместного наследо-

Таблица 2

Характеристика полиморфных маркеров, локализованных в хромосомной области 5q31.1-q33.1

Маркер	Расстояние от q-конца хромосомы 2 в м.п.н.	Тип полиморфизма	Число аллелей
D5S2060	158,13	Динукл.	11
C1159A	158,67	SNP	2

Таблица 3

Результаты анализа сцепления в хромосомной области 5q31.1-q33.1		
Маркер	MLS	Pc
D5S2060	1.58	NS
C1159A	0.31	NS

вания или отсутствия наследования этого аллеля обоими сибсами одновременно. Эта величина отражает корреляцию между идентичными по происхождению сибсами. Наличие корреляции свидетельствует о сцеплении полиморфного маркера с заболеванием.

Результаты исследования приводятся в табл. 3. Ни для одного из исследованных полиморфных маркеров не было показано предположительного сцепления (MLS>2,20) с СД1 в популяции больных русского происхождения.

Для проверки наличия сцепления СД1 с хромосомной областью 5q31.1-q33.1 провели альтернативное исследование неравновесной передачи аллелей от родителей к больным сибсам (TDT), дающее представление об ассоциации с заболеванием. Тест проводился на всех типах семей для каждого из полиморфных маркеров. Статистически значимая ассоциация не была показана ни для одного из исследованных маркеров. Таким образом, тест TDT подтвердил отсутствие связи локуса IDDM18 с СД1 в русской популяции больных.

Выводы

У больных СД1 русского происхождения не обнаружено сцепления и ассоциации локуса IDDM18 с заболеванием.

Литература

1. Davies, J.L., Kawaguchi, Y., Bennett, S.T. et al. A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes. // Nature. 1994. V. 371. P. 130-136.
2. Hashimoto, L., Habita, C., Beressl, J.P., et al. Genetic mapping of a susceptibility locus for insulin-dependent diabetes mellitus on chromosome 11q. // Nature. 1994. V. 371. P. 161-164.
3. Mein C.A, Esposito L., Dunn M.G., et al. A search for type 1 diabetes susceptibility genes in families from the United Kingdom. // Nat. Genet. 1998. V. 19. P. 297-300.
4. Concannon, P., Gogolin-Ewens, K.J., Hinds, D.A., et al. A second-generation screen of the human genome for susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. // Nat. Genet. 1998. 19(3), 292-296.
5. Cucca, F., Dudbridge, F., Loddo, M., et al. The HLA-DPB1 - associated component of the IDDM1 and its relationship to the major loci HLA-DQB1, -DQA1, and -DRB1. // Hum. Mol. Genet. 2001. V . 10. P. 2025-2037.
6. Bell, G.I., Horita, S., Karam, J.H. A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus. Diabetes. // 1984. V. 33. P. 176-183.
7. Nistico, L., Buzzetti, R., Pritchard, L.E., et al. The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. Belgian Diabetes Registry. // Hum. Mol. Genet. 1996. V. 5. P. 1075-1080.
8. Bottini, N., Musumeci, L., Alonso, A., et al. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. // Nat. Genet. 2004. V. 36. P. 337-338.
9. Morahan G., Huang D., Ymer S.I., et al. Linkage disequilibrium of a type I diabetes susceptibility locus with a regulatory IL12B allele. // Nat. Genet. 2001. V. 27(2). P. 218-21.
10. Adorini L. Interleukin 12 and autoimmune diabetes. // Nat. Genet. 2001. V. 27. P. 131-132.
11. Seegers D., Zwiers A., Strober W., et al. A TaqI polymorphism in the 3'-UTR of the IL-12 p40 gene correlates with increased IL-12 secretion. // Genes Immun. 2002. V. 3(7) P. 419-23.
12. Nistico L., Giorgi G., Giordano M., et al. IL12B polymorphism and type I diabetes in the Italian population. // Diabetes. 2002. V.51. P. 1649-1650.
13. Holm P., Luthman H., Kockum I. No evidence for linkage in Swedish multiplex T1D familied IL12B on chromosome 5q33-34 // Ann. N Y Acad. Sci. 2003. V. 1005. P. 352-355.
14. McCormack R.M., Maxwell A.P., Carson D.J., et al. The IL12B 3' untranslated region DNA polymorphism is not associated with early - onset type I diabetes // Genes Immun. 2002. V.3. P. 433-5.
15. Bergholdt R., Ghandil P., Johannesen J., et al. Genetic and functional evaluation of an interleukin-12 polymorphism (IDDM18) in families with type I diabetes // J. Med. Genet. 2004. V.41. e39.
16. Davoodi-Semiromi A., Yang J.J., She J.X. IL12p40 is associated with type I diabetes in Caucasian-American families // Diabetes. 2002. V.51. P.2334-6.
17. http://www.gdb.org
18. http://www.ncbi.nlm.nih.gov
19. Risch N. Linkage strategies for genetically complex traits. II The power of affected relative pairs // Am. J. Hum. Genet. 1990. V. 46. P. 229-241.
20. Spielman R.S., McGinnis R.E., Evens W.J. Transmission test for linkage disequlibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) // Am. J. Hum. Genet. 1993. V. 53. P. 506-516.
21. Spielman R.S., Evens W.J. A sibship test for linkage in the presence of association: the sib transmission/disequilibrium test // Am. J. Hum. Genet. 1998. V. 62. P. 450-558.
22. http://spielman07.med.upenn.edu/TDT.htm