

АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА БЕЛКА ТЕПЛОВОГО ШОКА HSP70-1 СРЕДИ ЕВРОПЕОИДНОГО НАСЕЛЕНИЯ, ПРОЖИВАЮЩЕГО В ЗАПАДНО-СИБИРСКОМ РЕГИОНЕ**Алла Владимировна ШЕВЧЕНКО, Ольга Валерьевна ГОЛОВАНОВА, Владимир Иосифович КОНЕНКОВ***ГУ НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН,
630117, Новосибирск, ул. Академика Тимакова, 4*

Проведен анализ распределения частот аллельных вариантов гена HSP70-1 III класса HLA региона по трем полиморфным позициям среди европеоидов, проживающих в Западно-Сибирском регионе России. Выявлены региональные особенности распределения частот аллельных вариантов и гаплотипов HSP70-1 гена относительно европейских и азиатских популяций, что актуально при изучении генетических особенностей популяции и ассоциированности иммуногенетического полиморфизма генов HLA региона с патологиями.

Ключевые слова: белок теплового шока, европеоиды Западной Сибири, промоторный регион гена, главный комплекс гистосовместимости.

Введение

Широкий полиморфизм генов главного комплекса гистосовместимости (HLA), расположенного на коротком плече шестой хромосомы человека (6p21.3), имеет огромное значение при изучении генетических особенностей популяции и ассоциированности полиморфизма с заболеваниями. Показано, что HLA гены III класса менее полиморфны, чем HLA гены I и II классов, но кодируемые ими продукты функционально более разнообразны. Хорошо известно, что полиморфизм первичной структуры генов и уровень их экспрессии на клеточной поверхности влияют на характер иммунного ответа при патологии. В регионе HLA III класса между генами комплемента и генами суперсемейства TNF SE в 92 килобазах (kb) к теломере от C2 гена расположен локус HSP70 протяженностью 12 тысяч пар оснований [1]. Три гена этого семейства HSP70-1, HSP70-2 и HSP70-НОМ безинтронны и кодируют гомологичные белки из 641 аминокислотного остатка. Протяженность 5'-нетранслируемого региона HSP70-1 гена 217 пар оснований [1]. Как и большинство описанных генов HLA региона, гены HSP70 семейства полиморфны в кодирующих и не кодирующих областях [2,3]. Малая протяженность генов и их безинтронность позволила исследовать генетическую структуру очень подробно и выявить наиболее часто встречающиеся и функционально важные полиморфные позиции. Для HSP70-1 гена такими полиморфными позициями нетранслируемого региона являются: -110, +120, +190. В позиции -110 выявлены замены С→А, в позиции +120 Т→С и в пози-

ции +190 С→G, которые представляют интерес для исследователей [4].

Мы рассмотрели полиморфизм HSP70-1 гена в трех указанных выше полиморфных позициях среди Европеоидного населения, проживающего в Западно-Сибирском регионе России.

Материалы и методы

Обследовано 100 практически здоровых лиц европеоидного происхождения, проживающих в Западно-Сибирском регионе, среди них 39 мужчин и 61 женщина в возрасте от 16 до 43 лет. Геномную ДНК выделяли из цельной венозной крови стандартным методом высаливания. Фрагмент гена протяженностью 490 пар нуклеотидов был амплифицирован в 50 µl PCR реакционной смеси, содержащей 200µM каждого dNTP, 1x PCR буфер с 1,5 mM MgCl₂, 1 е.а. Tag DNA полимеразы («Сибэнзим», Новосибирск), по 25pM специфичных праймера 5'-CGGTTCCCTGCTCTCTGTGTC-3' и 5'-CGCCATGGAGACCAACACC-3' (температура отжига праймеров 65 °C) [2,5].

Для анализа полиморфизма промоторного региона HSP70-1 гена в позиции (-110) проводился Nested-PCR. Амплифицированный в первом туре фрагмент протяженностью 490 пар нуклеотидов подвергался реамплификации с использованием пары внутренних праймеров 5'GGCGAAACCCCTGGA 3' и 5'GGCGAAACCCCTGGA 3' и одного из праймеров первого тура 5'-CGCCATGGAGACCAACACC-3' с образованием ампликонов длиной 275 пар нуклеотидов. Состав реакционной смеси идентичен таковому в первом туре, за исключением пар праймеров, указанных выше. Температура

*Шевченко А.В. — канд.б.н., старш.н.с., e-mail: shalla64@mail.ru**Голованова О.В. — канд.б.н., н.с., e-mail: golovanova_olga@mail.ru**Коненков В.И. — академик РАМН, директор, e-mail: konenkov@soramn.ru*

Таблица 1

Распределение частот генотипов HSP70-1 в популяции европеоидов Западной Сибири

	Наблюдаемая частота N (%)	Ожидаемая частота N (%)	χ^2	P
HSP70-1(-110)				
A/A	26 (26,0)	28,62 (28,62)	0,23	0,634
A/C	55(55,0)	49,76 (49,76)	0,50	0,478
C/C	19(19,0)	21,62 (21,62)	0,28	0,599
HSP70-1(+120)				
T/T	75(75,0)	76,56 (76,56)	0,11	0,740
T/C	25(25,0)	21,8 (21,80)	0,25	0,616
C/C	0	1,56 (1,56)	2,02	0,155
Hsp70-1(+190)				
C/C	30(30,0)	27,56 (27,56)	0,10	0,755
C/G	45(45,0)	49,88 (49,88)	0,50	0,478
G/G	25(25,0)	22,56 (22,56)	0,11	0,740

отжига праймеров 67 °C при сохранении прочих условий амплификации. При гомозиготном нуклеотидном варианте A/A или C/C в позиции (-110) PCR реакция проходила только в одной из пробирок, при гетерозиготном варианте A/C в данной позиции продукты реакции идентифицировались в обеих пробирках.

Методом PCR-RFLP проводился анализ двух других полиморфных позиций в 5'-некодирующем регионе HSP70-1 гена. Для рестрикционного анализа использовался амплифицированный ранее фрагмент протяженностью 490 пар нуклеотидов. Замену C→T в позиции (+120) и G→C в позиции (+190) анализировали с использованием эндонуклеаз рестрикции *AsuCII* и *AccBSI* (СибЭнзим, Новосибирск) соответственно. Гидролиз проводили в 20μl реакционной смеси, включающей 10μl амплификата. При гидролизе амплифицированный фрагмент расщеплялся на два фрагмента, длиной 365 и 125 пар нуклеотидов в присутствии сайта *AsuCII* и длиной 465 и 25 пар нуклеотидов в присутствии сайта *AccBSI*. Продукты амплификации и гидролиза были визуализированы в ультрафиолетовом свете после электрофореза в 2 % агарозном геле для полиморфной позиции (-110) и (+120), и в 2,5% агарозном геле для позиции (+190).

Статистическая обработка проводилась с использованием программы «Arlequin», version 2.000 (URL: <http://anthro.unige.ch/arlequin>). Сравнение частот аллелей проводили методом точной оценки Фишера.

Результаты исследования

Исследовался диаллельный полиморфизм регуляторного региона гена HSP70-1 в трех позициях -110, +120, +190. Частоты аллелей гена HSP70-1, приведенные в **таблице 1**

составили соответственно 0,465 и 0,535 (C_{-110} и A_{-110}), 0,125 и 0,875 (C_{+120} и T_{+120}) и 0,475 и 0,525 (G_{+190} и C_{+190}). Распределение частот генотипов в позициях -110, +120 и +190 HSP70-1 гена соответствовало равновесию Харди-Вайнберга. В позициях -110 и +190 отмечен высокий уровень гетерозиготности – 0,55 и 0,45 соответственно. Кроме того, не выявлено ни одного гомозиготного варианта CC в позиции +120 в исследуемой выборке.

Полиморфные нуклеотиды в позициях +120 и +190 расположены в 5' концевой некодирующей последовательности, протяженность которой для HSP70-1 гена составляет 217 пар оснований. Мутации в этой области ДНК последовательности могут приводить к изменениям при связывании транскрипта с рибосомой при трансляции и таким образом регулировать синтез белка [2]. Анализ частот гаплотипов по двум полиморфным позициям в обследуемой группе (**табл. 2**) показал, что в исследуемой группе преобладают гаплотипы HSP70-1*+120T/+190C с частотой 0,43 и HSP70-1*+120T/+190G с частотой 0,44 соответственно.

Нуклеотиды -110, +120 и +190 лежат в 5' фланкирующем регионе HSP70-1 гена, причем позиция -110 расположена точно 3 парами оснований выше теплового элемента (HSE), играющего ведущую роль в тепловой индукции экспрессии HSP70-1 гена [2]. Мы провели анализ гаплотипов по трем полиморфным позициям некодирующего региона гена HSP70-1. Выделены гаплотипы: HSP70-1*-110/+120/+190, встречающиеся в популяции с частотой, превышающей 10 процентов каждый: HSP70-1*-110A /+120T /+190C (0,216), HSP70-1*-110A /+120T/+190G (0,236),

Таблица 2

Частота гаплотипов HSP70-1*(+120)/(+190) и HSP70-1*(-110)/(+120)/(+190) в исследуемой группе N=100

	частота гаплотипа
HSP70-1*120/190	
CC	0,095
CG	0,030
TC	0,430
TG	0,445
HSP70-1*-110/120/190	
ACC	0,049
ACG	0,034
ATC	0,216
ATG	0,236
CCC	0,042
CTC	0,238
CTG	0,185

HSP70-1*-110C/+120T/+190G (0,185)
и HSP70-1*-110C/+120T/+190C (0,238).

Обсуждение

В проведенных нами исследованиях впервые в России изучены популяционные особенности распределения частот аллельных вариантов гена HSP70-1 на примере жителей Западной Сибири.

Проведенный анализ частот исследуемых аллельных вариантов в позиции -110 показал увеличение частоты С аллельного варианта (0,460) относительно азиатских групп (0,312), показанной в Тайваньской популяции [6] и значительное повышение частоты аллельного варианта С в позиции +190 (0,525) относительно китайской и японской популяции, где частота +190С оставляет 0,248 [7]. Данные по европейским популяциям — Италия, Англия, Франция — сильно варьируют. Так, среди итальянцев частота А и С аллельных вариантов в позиции -110 составляет соответственно 0,614 и 0,386 [5], среди англичан и французов — частота А₋₁₁₀ аллельного варианта составляет 0,384, частота С₋₁₁₀ 0,616 [8]. Анализ частот аллельных вариантов в позиции +190 среди испанцев выявил практически равное распределение С₊₁₉₀ (0,559) и G₊₁₉₀ (0,441), причем уровень гетерозиготности достигал 0,45 [9,10], что соответствует распределению в исследуемой нами группе. Слабая изученность полиморфизма HSP70-1 гена в популяциях и отсутствие данных по территориально прилегающим славянским и азиатским народностям не позволяет делать более глубокий анализ участия европеоидного и монголоидного компонента в формировании

популяционных особенностей полиморфизма исследуемого гена.

Особенности HSP70-1 гаплотипов, включающих полиморфные позиции в регионе тепловой регуляции и регионе, регулирующем трансляцию, могут оказывать непосредственное влияние на экспрессию белка. Кроме того, многими исследователями показана связь полиморфизма HSP70 генов с рядом заболеваний, включая СКВ, рассеянный склероз, саркоидоз, инсулин-зависимый сахарный диабет, ряд патологий суставов, атеросклероз [11,12,13], причем данные по разным популяциям зачастую неоднозначны. В проведенных нами исследованиях впервые проанализировано распределение частот аллельных вариантов, генотипов и гаплотипов в европеоидной популяции среди жителей Западно-Сибирского региона России и выявлены генетические особенности по трем полиморфным точкам некодирующего региона гена HSP70-1, что имеет важное значение для популяционных исследований и, что особенно важно, для анализа особенностей иммуногенетических патологий в регионе.

Литература

1. Milner CM., Campbel RD. Structure and expression of the three MHC-linked HSP70 genes // Immunogenetics. 1990. 32:242-251.
2. Milner CM., Campbel RD. Polymorphic analysis of the three MHC-linked HSP-70 genes // Immunogenetics. 1992.36:357-362.
3. Fagan M.B., Weissman I.L. Linkage analysis of HSP70 genes and historecognition locus in botryllus schlosseri // Immunogenetics. 1998.47(6):468-476.
4. Favatier F., Bornman L., Hightower L.E. et. all. Variation in hsp gene expression and Hsp polymorphism: do they contribute to differential disease susceptibility and stress tolerance? // Cell Stress Chaperones. 1997. 2 (3):141-155.
5. Cascino I., Sorrentino R., Tosi R. Strong genetic association between HLA-DR 3 and a polymorphic variation in the regulatory region of the HSP70-1 gene // Immunogenetics. 1993. 37: 177-182.
6. Fung H.C., Chen C.M., Wu Y.R. et. all. Heat Shock Protein 70 and Tumor Necrosis Factor Alpha in Taiwanese Patients with Dementia // Dement Geriatr Cogn Disord. 2005. 20:1-7.
7. Jing-an L., Wen-qing L., De-fu Y., Yue-yong Z. Analysis of heat shock protein 70 gene polymorphisms in Fujian Han Population of China // Chinese Journal of Microbiology and Immunology. 2005. 25:786-789.
8. Bolla M.K., Miller G.J., Yellon D.M. et. all. Analysis of the association of a heat shock protein 70-1 gene promoter polymorphism with myocardial infarction and coronary risk traits // Dis Markers. 1998. 13(4): 227-235.
9. Vinasco J., Beraun Y., Nieto A. et. all. Heat shock protein 70 gene polymorphisms in rheumatoid arthritis // Tissue Antigens. 1997. 50(1):71-73.

10. Fraile A., Nieto A., Mataran L., Martin J. HSP70 gene polymorphism in ankylosing spondylitis // Tissue Antigen. 1998. 51:382-385.
11. Ishihara M., Ohno S. Genetic polymorphism of compatibility complex in sarcoidosis. Tissue // Antigens. 1995. 46:59-62.
12. Aron Y., Polla BS., Dusser D. et. all. Genetic analysis of hsp70-1 gene regulatory region in allergic asthma // Eur.Resp. J. 1995.8(19):535-536.
13. Aron Y., Busson M., Polla BS., Dusser D. Analysis of hsp70 gene polymorphism in allergic asthma // Allergy. 1999. 54(2):165-170.

THE ANALYSIS HSP70-1 GENE POLYMORPHISM IN THE WESTERN SIBERIAN CAUCASIAN

Alla Vladimirovna SHEVCHENKO, Olga Valerievna GOLOVANOVA, Vladimir Iosifovich KONENKOV

Russian Academy of Medical Sciences, Siberian Division, Research Institute of Clinical & Experimental Lymphology, 4, Ac. Timakov str., Novosibirsk, 630117

The analysis of distribution of three polymorphic positions in HSP70-1 gene was carried out in the Western Siberian Caucasian. We have detected the regional features in distribution of HSP70-1 alleles and haplotypes frequencies in comparison with the European and Asian populations. It is impotent for population genetic studies and studies of HLA polymorphism associations with diseases.

Key words: heat shock protein, Western Siberian Caucasian, gene promoter region, Human major histocompatibility complex (HLA).

Shevchenko A.V. — PhD, e-mail: shalla64@mail.ru

Golovanova O.V. — PhD, e-mail: golovanova_olga@mail.ru

Konenkov V.I. — DM, Professor, Head of Research, e-mail: konenkov@soramn.ru