

Идентификация аллелей генов TAF5L и PTPN22, предрасполагающих к развитию сахарного диабета тип 1 в ядерных семьях больных сахарным диабетом тип 1

Ю.В. Кудряшова, А.А. Костарева, Е.О. Улупова, А.В. Клушина, О.В. Калинина,
В.С. Грызина, Е.Н. Гринева

ФГУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова Росмедтехнологий», Санкт-Петербург, Россия

Кудряшова Ю.В. — клинический ординатор по специальности «эндокринология» в ФГУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова Росмедтехнологий» (ФГУ ФЦСКЭ); Костарева А.А. — к.м.н., заведующая научно-исследовательской лабораторией молекулярной кардиологии ФГУ ФЦСКЭ; Улупова Е.О. — клинический ординатор по специальности «эндокринология» в ФГУ ФЦСКЭ; Клушина А.В. — к.б.н.; Калинина О.В. — научный сотрудник; Грызина В.С. — научный сотрудник; Гринева Е.Н. — д.м.н., профессор кафедры факультетской терапии Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. ак. И.П. Павлова, заведующая научно-исследовательской лабораторией эндокринологии ФГУ ФЦСКЭ.

Контактная информация: ФГУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова Росмедтехнологий», ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Россия, 197341. E-mail: jkudryashova@mail.ru (Кудряшова Юлия Владимировна).

Резюме

Цель исследования. В работе изучалась ассоциация полиморфизмов генов PTPN22 и TAF5L с развитием сахарного диабета тип 1. **Материалы и методы.** Было обследовано 154 ядерные семьи конкордантных или дискордантных по сахарному диабету тип 1 sibсов и 200 здоровых пациентов в качестве контроля. Проведено генотипирование мононуклеотидных замен в генах PTPN22: (-1123), 549, 620, 692, 757 и TAF5L: 241, 375, 744, 1362. **Результаты.** Обнаружено достоверное увеличение частоты генотипа AA и снижение частоты генотипа CC в группе больных сахарным диабетом тип 1 в кодоне 744 гена TAF5L. Для полиморфизма промоторной области (-1123) гена PTPN22 показано значимое снижение частоты аллеля G и повышение частоты аллеля C и генотипа CC в группе больных. **Выводы.** Результаты, полученные в ходе работы, могут способствовать пониманию событий, приводящих к развитию сахарного диабета тип 1, в дальнейшем содействовать разработке терапевтических подходов к предотвращению развития и лечения заболевания.

Ключевые слова: сахарный диабет тип 1, PTPN22, TAF5L, ПДРФ.

Identification of alleles of genes TAF5L and PTPN22 predisposing to Type 1 Diabetes in nuclear affected families

J.V. Kudryashova, A.A. Kostareva, E.O. Ulupova, A.V. Klushina, O.V. Kalinina,
V.S. Grizina, E.N. Grineva

Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, St Petersburg, Russia

Corresponding author: Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, 2 Akkuratov st., St Petersburg, Russia, 197341. E-mail: jkudryashova@mail.ru (Kudryashova Julia, Resident at Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre).

Abstract

Objective. Type 1 Diabetes (T1D) is a multigenic autoimmune disease. In this study polymorphism association between PTPN22, TAF5L genes and T1D was investigated. **Design and methods.** 154 nuclear families, each containing affected children with T1D and non-diabetic siblings were studied. The control group consisted of 200 healthy individuals. Single nucleotide polymorphism genotyping of PTPN22 gene: (-1123), 549, 620, 692, 757 and TAF5L gene: 241, 375, 744, 1362 were investigated. **Results.** The increase of AA genotype frequency and the decrease of CC genotype frequency was observed in T1D affected group in 744 codone of the TAF5L gene. The decrease of allele G frequency and the increase of allele C frequency in genotype CC in promoter loci (-1123) of PTPN22 gene were observed in T1D affected group. **Conclusion.** These data provide a better understanding of mechanisms underlying development of diabetes mellitus and could potentially lead to novel approaches to its treatment.

Key words: type 1 diabetes, PTPN22, TAF5L, RLFP.

Статья поступила в редакцию: 21.04.09. и принята к печати: 05.10.09.

Введение

Сахарный диабет тип 1 — это заболевание, характеризующееся гипергликемией натощак и в течение всего дня и абсолютным дефицитом инсулина, возникающее в результате деструкции β -клеток поджелудочной железы [1]. Для сахарного диабета тип 1 ясно выявлена тенденция к семейной ассоциации болезни. Тем не менее отягощенный семейный анамнез имеет место только у 10 % детей с впервые выявленным диабетом. Риск развития заболевания у однояйцевых близнецов составляет 35 %, а у сиблингов — 5–6 %.

В целом по России заболеваемость сахарным диабетом тип 1 составляет приблизительно 0,1–0,3 % (16:100 000 населения). К 2005 году в Российской Федерации было зарегистрировано примерно 230 000 пациентов, страдающих сахарным диабетом тип 1. Заболевание развивается преимущественно в возрастной группе до 30 лет, в целом по России заболеваемость и распространенность сахарного диабета тип 1 у детей соответствует средним эпидемиологическим показателям в мире, с наиболее высоким уровнем заболеваемости в возрастной группе 10–14 лет.

К настоящему моменту очевидным является тот факт, что сахарный диабет тип 1 — это комплексный, сложный фенотип, на который влияют многочисленные генетические факторы и факторы окружающей среды [2].

Несмотря на большой объем проведенных работ и опубликованных данных, в настоящее время достоверно в различных популяциях доказана роль только четырех генов в предрасположенности к сахарному диабету тип 1: HLA, INS (промоторный регион инсулина), CTLA4 (цитотоксический Т-лимфоцитарный антиген 4), IL2RA (рецептор интерлейкина). Актуальным является поиск новых локусов и генов, ассоциированных с развитием сахарного диабета тип 1. Среди новых хромосомных локусов и потенциальных диабет-ассоциированных генов несколькими авторами была выявлена связь с генами *PTPN22*, *TAF5L*. Однако эти данные не были воспроизведены во всех исследуемых популяциях. Актуальным представляется исследование ассоциации перечисленных выше генов с развитием сахарного диабета тип 1 в российской популяции.

Продукт гена *TAF5L* — TAF5-like RNA polymerase II (PCAF)-associated factor, 65 kDa subunit 5L (или PCAF-associated factor 65 β (PAF65- β (PAF65B))).

Этот белок является компонентом комплекса ацетилаз гистонов PCAF (p300/CBP associated factor). TAF5L принадлежит к семейству белков WD-repeat TAF5. Домен WD40 (а.к.:332–581) обнаружен в ряде эукариотических белков, выполняющих разнообразные функции в таких процессах, как передача сигнала, процессинг пре-мРНК и сборка цитоскелета.

Помимо гистонов, PCAF также ацетилирует и негистоновые белки. PCAF осуществляет ацетилирование ряда транскрипционных факторов, в число которых входит и NF- κ B — транскрипционный фактор для многочисленных генов, участвующих в иммунном ответе, ответе острой фазы и воспалении [7]. По-видимому, именно с этой функцией связано его участие в патогенезе сахарного диабета тип 1.

Ген *PTPN22* (1p13)

Продукт гена *PTPN22* принадлежит семейству тирозиновых фосфатаз (Lyp). Для представителей этого семейства характерно наличие каталитического домена (примерно 200–300 а.к. остатков). Тирозиновые фосфатазы подразделяют на связанные с мембраной рецепторы и цитоплазматические фосфатазы.

Lyp выступает в роли иммуномодулятора (4). Lyp подавляет активацию Т-клеток путем дефосфорилирования трех киназ — Lck, ZAP-70 и Fyn, важных для внутриклеточной передачи сигнала от Т-клеточного рецептора [5–7]. Также Lyp подавляет активацию Т-клеток посредством взаимодействия с супрессором киназы Src (негативным регулятором киназы Src), известным как Csk (C-terminal Src tyrosine kinase). Два варианта белка Lyp, кодируемые двумя аллелями 1858C и 1858T, различаются по одному ключевому, критическому аминокислотному остатку. Вариант (620W), кодируемый более редкой аллелью 1858T и ассоциированный с T1D и другим аутоиммунным заболеваниями, не взаимодействует с Csk [7]. Это, вероятно, приводит к изменению нормальной функции этого белка как супрессора активации Т-клеток (negative regulators of T cell activation) [7–8] и является важным для развития сахарного диабета тип 1.

Материалы и методы

Было обследовано 154 ядерные семьи конкордантных или дискордантных по сахарному диабету тип 1 сиблингов, имеющих возраст манифестации заболевания до 20 лет. Исследование проводилось в русской популяции. 103 семьи наблюдались на базе медицинских учреждений Санкт-Петербурга и Ленинградской области (ФГУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова Росмедтехнологий», Городской Диабетологический центр № 1, Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Областная клиническая больница), 23 семьи состояли на учете в Областной больнице города Вологда, 17 семей являлись пациентами Областной больницы города Мурманск, и 11 семей курировались в Республиканской больнице города Петрозаводск.

В качестве контрольной группы сравнения использовались практически здоровые люди (200 добровольных доноров) в возрасте до 40 лет, принадлежащие русской популяции. Критерием отбора пациентов в группу контроля являлось отсутствие сахарного диабета тип 1, а также отсутствие аутоиммунных, сердечно-сосудистых и иных заболеваний.

Диагноз сахарный диабет тип 1 ставился согласно критериям Национальных клинических рекомендаций по эндокринологии Российской ассоциации эндокринологов и основывался на обязательном определении глюкозы в плазме крови, а также типичной клинической симптоматике (прогрессивное снижение массы тела, развитие кетоацидоза, необходимости введения экзогенного инсулина). Для подтверждения диагноза использовалось определение, по меньшей мере, одного из следующих показателей: антитела к глютаматдекарбоксилазе и/или антитела к тирозинфосфатазе.

После предварительного подписания информированного согласия в исследование было включено 154 ядерных семьи, из которых 146 семей являлись симплексными и 8 семей — мультиплексными. 125 семейных пар имели по двое детей, 26 семейных пар — по трое детей, три семьи имели четырех и более детей. Общий объем исследуемой выборки sibсов составил 352 человека, из них 184 конкордантных по сахарному диабету тип 1 и 148 дискордантных по сахарному диабету тип 1 sibсов.

Исследуемая выборка была однородна по полу и включала 181 женщину (у 100 женщин был сахарный диабет тип 1, 81 женщина была здорова) и 171 мужчину (84 являлись здоровыми и 87 мужчин страдали сахарным диабетом тип 1).

Средний возраст дебюта сахарного диабета тип 1 составил 11 лет. Средний возраст пациентов на момент осмотра — 23 года.

Хронические осложнения сахарного диабета тип 1 были выявлены у 116 пациентов. В структуре заболеваемости 27 % составила диабетическая ретинопатия, 42 % — диабетическая полинейропатия, 30 % — диабетическая нефропатия. Иные формы хронических осложнений сахарного диабета тип 1, такие как ортостатическая гипотензия, удлинение интервала QT, гастропарез, эректильная дисфункция, составили менее 1 % случаев.

У 25 пациентов были выявлены следующие аутоиммунные заболевания: аутоиммунный тиреоидит (22 пациента), аутоиммунный гипокортицизм (1 пациент), аутоиммунная тромбоцитопения (2 пациента). Все исследуемые пациенты находились на интенсивной инсулинотерапии.

В работе использовались стандартные молекулярно-генетические манипуляции. Геномную дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) выделяли из лейкоцитов периферической крови на колонках Ахуген, затем с помощью электрофореза проверяли качество выделения ДНК.

Исследованные нами мононуклеотидные замены (SNP) в генах *PTPN22*, *TAF5L* приводят к возникновению новых или исчезновению ранее существовавших сайтов рестрикции, поэтому генотипирование данных SNP было выполнено с помощью анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. Фрагменты ДНК, содержащие SNP, амплифицировали с помощью Taq-полимеразы («SybEnzyme»), в качестве маркера использовали 100 п.н. ДНК-маркер производства компании «СибЭнзим».

Результаты и обсуждение

В ходе данной работы проводили исследование российской популяции Северо-Запада дискордантных и конкордантных по сахарному диабету тип 1 sibсов. С этой целью было проведено генотипирование мононуклеотидных замен в генах *PTPN22*, *TAF5L* и проанализированы ассоциации данных SNP с сахарным диабетом тип 1. Были рассмотрены как SNP, ассоциированные с сахарным диабетом тип 1 в других популяциях, так и те SNP, ассоциация которых с сахарным диабетом тип 1 является спорной из-за различий в результатах отдельных групп исследователей.

Поскольку в ряде предыдущих работ [2, 9] была продемонстрирована достоверная связь между некоторыми SNP в гене *TAF5L* T1D, в первую очередь были проанализированы нуклеотидные замены в составе данного гена, а также генов, потенциально способных участвовать в развитии сахарного диабета тип 1 (*ADPRT*, *ITPKB*). Помимо уже описанных в работах других авторов (в том числе и в российской популяции) SNPs 248 и 454 кодонов гена [2, 9], были исследованы ранее не анализированные SNPs, затрагивающие структурно-функциональные участки, потенциально способные вызывать изменения функционирования продуктов генов, которые могут приводить к повышению риска развития заболевания.

Таблица 1

РЕЗУЛЬТАТЫ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ SNPS В ГЕНЕ TAF5L

Ген	Референс-номер исследуемого SNP	Номер кодона исследуемого SNP (в скобках указан номер нуклеотида)	Частоты генотипов		
			Частоты генотипов в исследуемой группе (n = 150)	Частоты генотипов в контрольной группе (n = 200)	X ² , p
TAF5L	rs 3753886	codon 248 (744)	AA 0,24 AC 0,38 CC 0,38	AA 0,14 AC 0,40 CC 0,46	X ² = 4.2 P = 0,01*
	rs 2295625	codon 454 (1362)	CC 0,23 TC 0,56 TT 0,21	CC 0,17 TC 0,52 TT 0,31	X ² = 2.0 P = 0,34
	rs 55655740	codon 241	CC 0,985 TC 0,015 TT 0	CC 0,98 TC 0,02 TT 0	N/A
	rs 41304137	codon 375	TT 0,995 TC 0,005 CC 0	TT 0,99 TC 0,01 CC 0	N/A

Таблица 2

РЕЗУЛЬТАТЫ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ SNPS В ГЕНЕ RTPN22

Ген	Референс-номер исследуемого SNP	Номер кодона исследуемого SNP (в скобках указан номер нуклеотида)	Частоты генотипов		
			Частоты генотипов в исследуемой группе (n = 150)	Частоты генотипов в контрольной группе (n = 200)	X ² , p
RTPN22	rs2476601	codon 620 (1858)	CC 0,66 TC 0,27 TT 0,07	CC 0,66 TC 0,33 TT 0,01	X ² = 13 P = 0,002*
	rs2488457	(-1123) промотор	CC 0,20 GC 0,32 GG 0,48	CC 0,08 GC 0,36 GG 0,56	X ² = 10.1 P = 0,006*
	(11)	codon 549 (1647) экзон 13	GG 1,0	GG 1,0	N/A
	(11)	codon 692 (2075) экзон 17	CC 1,0	CC 1,0	N/A
	(11)	codon 757 (2271) экзон 19	CC 1,0	CC 1,0	N/A

Исследование путем генотипирования SNPs проводилось по схеме сравнения случай-контроль в группе неродственных больных сахарным диабетом тип 1 с манифестацией заболевания в возрасте до 20 лет (n = 150). В качестве контрольной группы использовались здоровые доноры (n = 203). Результаты генотипирования SNPs в гене TAF5L представлены в таблице 1.

Поскольку все полученные частоты генотипов достоверно не отличались от ожидаемых, что свидетельствовало об устойчивости популяционной частоты исследуемых аллелей, следующим этапом было проведено сравнение частот аллелей и генотипов в исследуемой и контрольной группах (табл. 1). При исследовании кодона 744 гена TAF5L было обнаружено достоверное увеличение частоты генотипа AA и снижение частоты генотипа CC в группе больных сахарным диабетом тип 1. Исследование кодона 1362 не выявило достоверной связи между распределением частот аллелей T и C и сахарным диабетом тип 1. Причиной, по которой в нашей работе данная ассоциация не достигла достоверного уровня значимости, может являться не очень большой объем выборки больных сахарным диабетом тип 1.

В дополнение к исследованным генотипам кодона 744 и кодона 1362 гена TAF5L были исследованы два новых, ранее не изученных SNPs в кодонах 241 и 375. Как видно из таблицы 1, частота встречаемости аллеля T в кодоне 241 и аллеля C в кодоне 375 составляет менее 1 %, а гомозиготные генотипы TT и CC (для 241 и 375 соответственно) не встречаются. Сходные данные были получены и для генов ADPRT, ITPKB (кодоны 940, 827 и 632 соответственно). Полученные данные говорят в пользу малой значимости данных SNPs в российской популяции и малой вероятности их ассоциации с сахарным диабетом тип 1.

Ассоциация гена RTPN22 с развитием аутоиммунных заболеваний и, в частности, с сахарным диабетом тип 1, ранее была показана многими исследователями. Однако для российской популяции ассоциация между полиморфизмом гена RTPN22 и развитием сахарного диабета тип 1 достоверно доказана не была. В нашей работе исследовались как наиболее частый и хорошо изученный полиморфизм гена RTPN22 в кодоне 620 (C/T) и полиморфизм (-1123) промоторной области, так и ряд новых, ранее мало изученных полиморфизмов (кодон 549, кодон 692, кодон 757). Для SNPs кодона 620 было показано значимое увеличение частоты гомозиготного генотипа TT в группе больных сахарным диабетом тип 1. Однако при сравнении абсолютных частот аллелей достоверного уровня значимости достигнуто не было. Данный факт отчасти может объясняться сложностью статистического сравнения в небольших выборках при малых частотах аллеля в популяции, что и наблюдается в случае полиморфизма кодона 620 гена RTPN22. Для полиморфизма промоторной области (-1123) гена RTPN22 было показано значимое снижение частоты аллеля G и повышение частоты аллеля C и генотипа CC в группе больных сахарным диабетом тип 1 (табл. 2). В дополнение к исследованным генотипам были исследованы три ранее мало изученные и описанные в японской популяции SNPs в кодонах 549, 692 и 757 гена RTPN22.

Выводы

Данные, полученные в нашей работе по выявлению полиморфизмов, ассоциированных с сахарным диабетом тип 1 в популяции Северо-Запада, могут способствовать выявлению людей (жителей нашего региона) с повышенным риском развития сахарного диабета тип 1 (входящих в группу риска). Помимо этого, установление генотипов,

вызывающих предрасположенность к заболеванию, может способствовать пониманию событий, приводящих к развитию сахарного диабета тип 1, а в дальнейшем содействовать разработке терапевтических и профилактических подходов.

Литература

1. American Diabetes Association. Position statement: diagnosis and classification of diabetes mellitus // Diabetes Care. — 2008. — Vol. 31 (Suppl. 1). — P. S55–S60.
2. Zheng W., She J.X. Genetic association between a lymphoid tyrosine phosphatase (PTPN22) and type 1 diabetes // Diabetes. — 2005. — Vol. 54, № 3. — P. 906–908.
3. Kim M.S., Polychronakos C. Immunogenetics of type 1 diabetes // Horm. Res. — 2005. — Vol. 64, № 4. — P. 180–188.
4. Duffy D.L. Genetic determinants of diabetes are similarly associated with other immune-mediated diseases // Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. — 2007. — Vol. 7, № 6. — P. 468–474.
5. Mustelin T., Rahmouni S., Bottini N. et al. Role of protein tyrosine phosphatases in T cell activation // Immunol. Rev. — 2003. — Vol. 191. — P. 139–147.
6. Hill R.J., Zozulya S., Lu Y.L. et al. The lymphoid protein tyrosine phosphatase Lyp interacts with the adaptor molecule Grb2 and functions as a negative regulator of T-cell activation // Exp. Hematol. — 2002. — Vol. 30, № 3. — P. 237–244.
7. Bottini N., Musumeci L., Alonso A. et al. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type 1 diabetes // Nat. Genet. — 2004. — Vol. 36, № 4. — P. 337–338.
8. Begovich A.B., Carlton V.E., Honigberg L.A. et al. A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis // Am. J. Hum. Genet. — 2004. — Vol. 75, № 2. — P. 330–337.
9. Chistiakov D.A., Chernisheva A., Savost'yanov K.V. et al. The TAF5L gene on chromosome 1q42 is associated with type 1 diabetes in Russian affected patients // Autoimmunity. — 2005. — Vol. 38, № 4. — P. 283–293.

Работа выполнена в рамках Федеральной целевой программы «Предупреждение и борьба с социально значимыми заболеваниями (2007–2011 годы)», подпрограмма «Сахарный диабет», при поддержке Министерства Здравоохранения и социального развития Российской Федерации (Грант «Идентификация аллелей и генотипов в хромосомной области 1q42 и в генах IFIH1 и PTPN22, предрасполагающих к развитию сахарного диабета тип 1 в ядерных семьях больных сахарным диабетом тип 1»).