

ПОЛИМОРФИЗМ ДВУХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ *LIG4* У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ КОРЕННОГО И ПРИШЛОГО НАСЕЛЕНИЯ КЕМЕРОВСКОЙ ОБЛАСТИ

*А. Н. Волков, А. И. Мартынюк, А. В. Ларионов, Д. К. Шишкова,
В. И. Минина, А. А. Тимофеева, В. Г. Дружинин*

POLYMORPHISM OF TWO *LIG4* GENETIC MARKERS IN THE INDIGENOUS AND MIGRANT POPULATION OF KEMEROVO REGION

*A. N. Volkov, A. I. Martinyuk, A. V. Larionov, D. K. Shihkova,
V. I. Minina, A. A. Timopheeva, V. G. Druzhinin*

Работа поддержана государственным контрактом ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007 – 2012 годы» № 16.512.11.2062; грантом РФФИ, 10-04-00497-а.

Работа выполнена на кафедре генетики биологического факультета КемГУ.

Изучены популяционно-генетические характеристики двух полиморфных маркеров *LIG4* среди коренного (шорцы) и пришлого (русские) населения Кемеровской области. Частоты генетических вариантов полиморфизма Ala3Val достоверно не отличались в двух группах. В то же время выявлено достоверное отличие распределений генотипов и аллелей полиморфизма Thr9Ile между этническими когортами. Среди представителей пришлого населения частота минорного аллеля Ile почти втрое превышала показатель, характерный для коренного этноса.

The population genetic characteristics of two *LIG4* polymorphic markers were examined in the indigenous (the Shors) and migrant (the Russians) population of Kemerovo region. The frequencies of genetic variants of Ala3Val polymorphism did not differ significantly between the two groups. At the same time a significant difference of the genotypes and allele polymorphism of Thr9Ile distributions between the ethnic cohorts was revealed. Minor allele Ile frequency among the representatives of the migrant population was almost three times as high as that of the indigenous ethnic group.

Ключевые слова: *LIG4*, генетический полиморфизм.

Keywords: *LIG4*, genetic polymorphism.

Лигаза-4 является ключевым ферментом механизма негомологичного воссоединения концов ДНК (NHEJ), задействованным в репарации двуниевых разрывов этой молекулы у млекопитающих [3, с. 185 – 211]. К настоящему времени в гене лигазы-4 (*LIG4*) человека идентифицированы несколько мутаций, приводящих к снижению активности фермента в результате аминокислотных замен в функционально значимых доменах [2, с. 2369 – 2376]. Гомозиготное состояние одновременно по нескольким из этих замен может иметь патологическое проявление в виде «синдрома *LIG4*» (OMIM 606593), что связано с панцитопенией, микроцефалией, задержкой развития.

Среди клинически значимых мутаций *LIG4* заметной вариабельностью в различных популяциях человека обладают лишь две в 3 (*rs1805389*) и 9 (*rs1805388*) кодонах. Оба полиморфизма связаны с нуклеотидными заменами (*C4044T* и *C4062T*) и приводят к изменению аминокислотного состава Ala3Val и Thr9Ile в зрелом белке. Каждая из указанных мутаций самостоятельно не является причиной каких-либо заметных патологических изменений в организме, но при этом не исключается возможность снижения активности фермента. В такой ситуации интенсивное лучевое воздействие в ходе медицинских процедур или проживания в экологически неблагоприятных условиях может спровоцировать появление клинического эффекта, как это было показано в отношении еще одной мутации *LIG4* в 278 кодоне [8, с. 699 – 702].

Отдаленным эффектом некорректного восстановления ДНК после ее повреждений у индивидуумов с мутациями в *LIG4* может являться повышение риска возникновения различных онкопатологий. В связи с этим в настоящее время ведется интенсивное изучение отдельных полиморфных вариантов данного гена как возможных предикторов различных форм рака [1, с. 2440 – 2446; 5, с. 2366 – 2373; 7, с. 5150 – 5160; 9 – 12].

Неодинаковая распространенность полиморфизмов *LIG4* у различных этносов может приводить к появлению отличий в чувствительности к средовым мутагенам в популяциях человека. В связи с этим целью исследования стало изучение частоты отдельных генетических вариантов двух полиморфных участков *LIG4* (*rs1805388* и *rs1805389*) среди коренного (шорцы) и пришлого (русские) населения Кемеровской области.

Материалы и методы

Были сформированы две группы обследованных, представляющие коренное и пришлое население юга Западной Сибири (Кемеровская область) и включающие шорцев и русских. Шорцы – тюркоязычный народ, имеющий официальный статус «коренного малочисленного народа Севера». Основная территория расселения шорцев – Горная Шория – бассейн среднего течения р. Томи и ее притоков – Кондомы и Мрассу. Выборка шорцев (n = 119) включала мальчиков и девочек, проживающих на территории Таштагольского района Кемеровской области, в возрасте 8 – 18 лет при среднем значении показателя 11,7 ± 0,17 лет.

В отличие от шорцев (коренное население) русские могут рассматриваться в качестве пришлого населения Сибири как представители белой расы (европеоиды). Выборка русских (n = 186) включала мальчиков и девочек в возрасте 8 – 19 лет (среднее значение показателя $13,7 \pm 0,23$ года) из различных территорий Кемеровской области.

Материалом для получения образцов ДНК послужила цельная кровь, забираемая в асептических условиях в вакуумные пробирки с ЭДТА. На каждого обследуемого ребенка был оформлен протокол информированного согласия, подписанный родителями либо лицами, осуществляющими опеку над несовершеннолетними.

Геномную ДНК выделяли хлороформ-фенольным методом. Для генотипирования полиморфизмов *rs1805388* и *rs1805389* гена *LIG4* использовали коммерческие наборы реагентов «SNP-экспресс» производства НПФ «Литех» г. Москва. Осуществляли аллель-специфическую ПЦР с последующей визуализацией результатов в 3 % агарозном геле с добавлением бромистого этидия. Статистический анализ первичных данных выполняли с помощью ППП «СТАТИСТИКА v. 6». Сопоставление распределений аллелей и генотипов в сравниваемых группах проводили методом χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность. Генетическое равновесие по изучаемым полиморфным системам оценивали по их соответствию уравнению Харди-Вайнберга. Статистически значимыми считали отличия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При оценке распределения генотипов маркеров *rs1805388* и *rs1805389* *LIG4* как среди обследованных шорцев, так и русских не было выявлено статистически значимого отличия от ожидаемого в соответствии с уравнением Харди-Вайнберга. Этот факт может свидетельствовать о состоянии генетического равно-

весия по исследованным полиморфизмам, сформировавшегося в изученных этнических группах при отсутствии интенсивной метисации между коренным и пришлым населением на данной территории.

Соотношение генотипов маркера *rs1805389* у изученных представителей шорского и русского населения Кемеровской области было практически идентичным и достоверно не отличалось. В обеих группах существенно преобладало сочетание Ala/Ala, составляя 86,73 % и 86,15 % в двух выборках соответственно (таблица 1). Минорным в двух этнических группах являлся аллельный вариант Val, его частота совпадала в сравниваемых когортах.

Сопоставление полученных данных с результатами ранее проводившихся исследований позволяет заключить, что установленные закономерности распространения генотипических и аллельных вариантов изучаемого сайта в выборке европеоидов юга Западной Сибири схожи с характеристиками, отмеченными у европеоидов Старого Света. Повсеместно значительно преобладает генотип Ala/Ala, а частота минорного аллеля составляет 0,07 – 0,08 [6, с. 997 – 1007; 9, с. 900 – 905] (таблица 1).

В ранее изучавшейся выборке азиатов (тайваньские китайцы) наблюдалось значительное повышение частоты минорного аллеля Val полиморфного маркера *rs1805389*, что приводило к увеличению доли гетерозигот за счет снижения встречаемости гомозиготного сочетания Ala/Ala [1] (таблица 1). Изученная нами выборка азиатского происхождения не характеризовалась указанной тенденцией, приближаясь по характеристикам к европеоидным группам. Вместе с тем цитированная работа оказалась единственным доступным источником для сравнения, что не позволяет вынести окончательное суждение о генетическом полиморфизме Ala3Val гена *LIG4* у различных групп коренного населения Азии.

Таблица 1

Полиморфизм Ala3Val (*rs1805389*) гена *LIG4* в различных этнических группах

Объем выборки	Генотип n, %			Частота минорного аллеля q (Val)	Группа	Источник
	Ala/Ala	Ala/Val	Val/Val			
N=113	98 (86,73)	14 (12,39)	1 (0,88)	0,07	Шорцы КО	СД
N=130	112 (86,15)	18 (13,85)	0	0,07	Русские КО	СД
N=845	748 (88,5)	66 (7,8)	31 (3,7)	0,08	Европеоиды (Западная Европа в целом)	[6]
N=220	189 (85,9)	31 (14,1)	0	0,07	Европеоиды (Великобритания)	[9]
N=379	284 (74,9)	87 (23,0)	8 (2,1)	0,14	Китайцы (Тайвань)	[1]

Примечание: КО – Кемеровская область; СД – собственные данные (здесь и далее).

В ходе дальнейшего изучения полиморфизма Thr9Ple (*rs1805388*) в двух группах обследованных выявлено достоверное отличие распределений генотипов данного маркера между этническими когортами ($\chi^2 = 19,9$ $p < 0,001$). В выборке шорцев частота основного генотипа Thr/Thr достигала 85,7 %, в то время как среди русских составляла 62,4 % (таблица 2). При этом в первой группе заметно снижена доля гетерозигот и отсутствовали гомозиготы Ple/Ple. Установленная закономерность объясняется спецификой со-

отношения аллельных вариантов изучаемого полиморфизма в двух группах. Среди представителей пришлого населения (русские) частота минорного аллеля Ple почти втрое превышала показатель, характерный для представителей коренного этноса (шорцы) ($\chi^2 = 18,0$ $p < 0,001$).

Полиморфизм Thr9Ile (*rs1805388*) гена *LIG4* в различных этнических группах

Объем выборки	Генотип n, %			Частота минорного аллеля q (Ile)	Группа	Источник
	Thr/Thr	Thr/Ile	Ile/Ile			
N = 119	102 (85,7) ***	17 (14,3) ***	0 ***	0,07 ***	Шорцы КО	СД
N = 186	116 (62,4)	67 (36,0)	3 (1,6)	0,20	Русские КО	СД
N = 805	570 (70,8)	211(26,2)	24 (3,0)	0,16	Европеоиды (Западная Европа в целом)	[6]
N = 220	149 (67,7)	58 (26,4)	13 (5,9)	0,19	Европеоиды (Великобритания)	[9]
N = 91	62 (68,1)	27 (29,7)	2 (2,2)	0,17	Европеоиды (Нидерланды)	[4]
N = 376	198 (52,7)	150 (39,9)	28 (7,4)	0,27	Китайцы (Тайвань)	[1]

Примечание: *** – отличия достоверны при $p < 0,001$ в сравнении с аналогичными показателями у русских КО.

Частотные характеристики генетических вариантов полиморфизма Thr9Ile гена *LIG4* среди европеоидов Старого Света были установлены в ряде независимых исследований (табл. 2). Генотип Thr/Thr преобладал с частотой 67,7 % – 70,8 %, а гомозиготы Ile/Ile в разных выборках составляли 2,2 % – 5,9 %. Частота минорного аллеля Ile во всех случаях не превышала 0,19 [4; 6; 9]. Установленные характеристики в целом сопоставимы с полученными нами данными.

Среди азиатских этносов может отмечаться заметное повышение частоты минорного аллеля Ile полиморфизма Thr9Ile. Так, среди китайцев, проживающих на Тайване, эта величина достигает 0,27, что приводит к относительному повышению доли редкого генотипа Ile/Ile [1; 10, с. 2939 – 2948]. На этом фоне неожиданной кажется противоположная тенденция, установленная в нашем исследовании и связанная со

снижением частоты аллеля Ile по сравнению с изученной группой европеоидов. Вместе с тем данные международной базы данных dbSNP показывают, что для отдельных выборок жителей Азии может быть характерна очень высокая частота аллеля Thr (до 94,4 %), что определяет резкое возрастание доли генотипа Thr/Thr (до 88,9 %) и исчезновение генотипа Ile/Ile (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>).

Завершая обсуждение полученных результатов, следует констатировать значимость этнического фактора в формировании популяционной частоты генотипических и аллельных вариантов полиморфизма Thr9Ile (*rs1805388*) гена *LIG4*. Это может иметь важное практическое значение, например, при оценке устойчивости представителей различных этносов к действию средовых факторов, нарушающих целостность генома человека.

Литература

1. Breast cancer risk associated with genotypic polymorphism of the nonhomologous end-joining genes: a multigenic study on cancer susceptibility / Y.-P. Fu [et al.] // *Cancer Research*. – 2003. – V. 63.
2. Analysis of DNA ligase IV mutations found in LIG4 syndrome patients: the impact of two linked polymorphisms / P.-M. Girard [et al.] // *Human Molecular Genetics*. – 2004. – V. 13.
3. Jeggo, P. A. DNA breakage and repair / P. A. Jeggo // *Adv. Genet.* – 1998. – V. 38.
4. Explorative study to identify novel candidate genes related to oxaliplatin efficacy and toxicity using a DNA repair array / D. M. Kweekel [et al.] // *British Journal of Cancer*. – 2009. – V. 101.
5. Genetic susceptibility to renal cell carcinoma: the role of DNA double-strand break repair pathway / V. Margulis [et al.] // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* – 2008. – V. 17.
6. DNA repair polymorphisms and cancer risk in non-smokers in a cohort study / G. Matullo [et al.] // *Carcinogenesis*. – 2006. – V. 27(5).
7. Etiologic heterogeneity among non-Hodgkin lymphoma subtypes / L. M. Morton [et al.] // *Blood*. – 2008. – V. 112 (13).
8. Identification of a defect in DNA ligase IV in a radiosensitive leukaemia patient / E. Riballo [et al.] // *Curr. Biol.* – 1999. – V. 19.
9. Genetic variants of NHEJ DNA ligase IV can affect the risk of developing multiple myeloma, a tumour characterised by aberrant class switch recombination / P. L. Roddam [et al.] // *J. Med. Genet.* – 2002. – V. 39.
10. Lung cancer susceptibility and prognosis associated with polymorphisms in the nonhomologous end-joining pathway genes / R.-C. Tseng [et al.] // *Cancer*. – 2009. – № 1.
11. Bladder cancer predisposition: a multigenic approach to DNA-repair and cell-cycle-control genes / X. Wu [et al.] // *American Journal of Human Genetics*. – 2006. – V. 78. – С. 464 – 479.
12. Genetic polymorphisms in double-strand break DNA repair genes associate with risk of oral premalignant lesions / H. Yang [et al.] // *Eur. J. Cancer*. – 2008. – V. 44(11). – С. 1603 – 1611.

Информация об авторах:

Волков Алексей Николаевич – кандидат биологических наук, доцент кафедры генетики КемГУ, старший научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории КемГМА, (384-2)580166, 89059493285, volkov_alex@rambler.ru.

Aleksey N. Volkov – Candidate of Biology, Assistant Professor at the Department of Genetics, Kemerovo State University; senior researcher at the Central Research Laboratory, Kemerovo State Medical Academy.

Мартынюк Александр Игоревич – аспирант кафедры генетики КемГУ.

Aleksander I. Martinyuk – post-graduate student at the Department of Genetics, Kemerovo State University.

Ларионов Алексей Викторович – инженер кафедры генетики КемГУ.

Alexey V. Larionov – engineer at the Department of Genetics, Kemerovo State University.

Шишкова Дарья Кирилловна – студентка 5 курса биологического факультета КемГУ.

Darya K. Shishkova – 5th-year student at the Biological Faculty, Kemerovo State University.

Минина Варвара Ивановна – кандидат биологических наук, доцент кафедры генетики КемГУ, старший научный сотрудник учреждения Российской академии наук Института экологии человека СО РАН.

Varvara I. Minina – Candidate of Biology, Assistant Professor at the Department of Genetics, Kemerovo State University; senior researcher at the Institute for Human Ecology of the Siberian branch of the RAS.

Тимофеева Анна Александровна – аспирант кафедры генетики КемГУ, инженер-технолог учреждения Российской академии наук Института экологии человека СО РАН.

Anna A. Timofeeva – post-graduate student at the Department of Genetics, Kemerovo State University; engineer at the Institute for Human Ecology of the Siberian branch of the RAS.

Дружинин Владимир Геннадьевич – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой генетики КемГУ, ведущий научный сотрудник учреждения Российской академии наук Института экологии человека СО РАН, 8(384-2)58-01-66, druzhinin_vladim@mail.ru.

Vladimir G. Druzhinin – Doctor of Biology, Professor, Head of the Department of Genetics, Kemerovo State University; leading researcher at the Institute for Human Ecology of the Siberian branch of the RAS.