

УДК: 577.29

Оценка потенциальной функциональной значимости полиморфизмов IVS2(+4) t/c, IVS4(-44) t/c и IVS5(-47) a/g гена HFE, ассоциированного с наследственным гемохроматозом человека

Михайлова С.В. ^{*1}, Бабенко В.Н.¹, Максимов В.Н.²,
Воевода М.И.², Кобзев В.Ф.¹, Ромащенко А.Г.¹

¹Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090, Новосибирск

²НИИ Терапии СО РАМН, 630089, Новосибирск

Аннотация. В данной работе предпринята попытка оценки функциональной значимости интронных полиморфизмов гена HFE. Продукт этого гена является одним из ключевых регуляторов метаболизма железа у человека. Определены частоты гаплотипов по полиморфизмам IVS2(+4)t/c, IVS4(-47)t/c, IVS5(-44)a/g гена HFE и их сцепленность с мутациями C282Y, H63D и S65S. Из теоретически возможных внутригенных гаплотипов гена HFE в различных этнических группах России обнаружилось четыре: TTG, TTA, СТА и ССА. Показана сцепленность мутации C282Y с гаплотипом TTG, H63D с СТА и S65C с ССА. Контекстный анализ выявил потенциальную функциональную значимость этих интронных полиморфизмов в ходе сплайсинга. Полиморфизм IVS2(+4)t/c расположен в донорном сайте сплайсинга и, как предполагается, может влиять на выбор 5'-сайта сплайсинга U1 РНП. Полиморфизм IVS 4(-44)t/c находится в позиции -5 потенциального донорного сайта сплайсинга. Все реальные и предполагаемые варианты пре-мРНК, включающие в себя удержанную последовательность 4 интрона, будут кодировать урезанные растворимые формы белка. Полиморфизм IVS5(-44)a/g расположен внутри блока, который гомологичен U6 мяРНК, и, кроме того, комплементарен участку U2 мяРНК. Для проверки предположения о функциональной значимости интронных полиморфизмов были оценены частоты гаплотипов по гену HFE в выборках пациентов с гемохроматозом (ГХ), синдромом перегрузки железом (СПЖ) и выборке долгожителей (ДЖ). Обнаружено достоверное снижение ($\chi^2=6.335$, $p=0.012$) частоты гаплотипа ССА в выборке пациентов с СПЖ относительно выборок ГХ и ДЖ.

Ключевые слова: наследственный гемохроматоз, HFE, гаплотип, альтернативный сплайсинг

Наследственный гемохроматоз (ГХ) — заболевание человека, вызываемое избыточным накоплением железа в печени, поджелудочной железе и других органах и тканях. В финальной стадии болезни у пациентов развивается меланодермия, диабет, цирроз, а затем и рак печени. Показано, что большинство случаев этого заболевания связано с носительством аллелей C282Y и H63D гена HFE [1], однако пенетрантность таких генотипов невысока. Кроме этого, эти и некоторые другие мутации гена HFE с

* mikhail@bionet.nsc.ru

повышенной частотой встречаются у пациентов с другими заболеваниями, связанными с нарушением метаболизма железа. Молекулярные функции белка HFE, в настоящее время широко обсуждаются. Показано, что HFE регулирует зависимое от трансферринового рецептора 1 типа усвоение железа многими типами клеток [2–5], этот белок необходим для нормальной регуляции синтеза хепсидина в печени и опосредованного хепсидином транспорта железа из макрофагов, энтероцитов и гепатоцитов [6–10], установлено прямое взаимодействие HFE с трансферриновым рецептором 2 типа [11]. Наблюдалось участие HFE в аллоактивации определённых типов Т-клеток мыши [12], а также его воздействие на презентацию антигенов классическими МНС I [13]. Подобно пре-мРНК других неклассических белков гистосовместимости I типа [14–16], транскрипты HFE подвергаются альтернативному сплайсингу. Обнаружено значительное число изоформ мРНК, однако их спектр существенно различается по данным разных авторов [17–20]. Одной из причин противоречивости данных может являться вариабельность структуры ДНК на участках гена, причастных к сплайсингу. В данной работе были оценены частоты широко распространённых интронных полиморфизмов IVS2(+4) t/c, IVS4(-44) t/c и IVS5(-47) a/g этого гена в выборке из 354 жителей России, относящихся к разным этническим группам (русские, финно-угры, алтайцы, тувинцы, казахи, чукчи, нивхи), методом оценки длины рестрикционных фрагментов продуктов полимеразной цепной реакции. В результате генотипирования было выявлено только 4 из 8-ми возможных для этих сайтов интронных гаплотипов: TTG, TTA, CTA и CCA. Выборка была проанализирована также по мутациям C282Y, H63D и S65C гена HFE, каждая из которых оказалась сцепленной только с одним из вариантов интронного гаплотипа. Результаты анализа неравновесия по сцеплению приведены в табл. 1.

Таблица 1. Неравновесие по сцеплению между мутациями C282Y (a), H63D (b) и S65C (c) гена HFE и внутригенными гаплотипами TTG, CTA и CCA, соответственно, WT — аллель без соответствующей мутации.

a	Интронный гаплотип		b	Интронный гаплотип		c	Интронный гаплотип	
	TTG	Not TTG		CTA	Not CTA		CCA	Not CCA
C282Y	44	0	H63D	87	0	S65C	5	0
WT*	169	367	WT	33	434	WT	112	482
χ^2 (df=1)	82.1		373.4		20.8			
P-value	1.3e ⁻¹⁹		3.6e ⁻²⁹		5.2e ⁻⁶			

Анализ последовательностей HFE из баз данных [21] показал, что наиболее гетерогенными являются последовательности с гаплотипами TTG и CTA. Они состоят из эволюционно отличающихся подгрупп последовательностей TTG1, 2, 3 и CTA1, 2, 3 соответственно. Последовательности с гаплотипами TTA и CCA относительно гомогенны. На рис.1 представлена схема расположения некоторых полиморфизмов, описанных в [21], пронумерованных согласно GenBank accession no. Z92910, в различных гаплотипических вариантах гена HFE.

последовательности гена HFE у человека. Подобная конвергенция может свидетельствовать в пользу предположения о функциональной значимости полиморфного сайта.

Данные контекстного анализа участков ДНК, где расположены исследованные нами полиморфизмы IVS2(+4) t/c, IVS4(-44) t/c и IVS5(-47) a/g, также указывают на высокую вероятность вовлечения их в сплайсинг альтернативных форм мРНК HFE, т.к. все они расположены на расстоянии менее 50 н.п. от границ интронов.

IVS2 (+4) t/c

Полиморфизм IVS2(+4) t/c находится в интроне в непосредственной близости от границы донорного сайта, который, как считается, влияет на выбор 5'-сайта сплайсинга (5'сс) в ходе формирования сплайсосомы [23–26]. Большинство последовательностей 5'сс человека соответствует консенсусу A₂G₁/G₁U₂R₃A₄G₅U₆, где R — пуриновый нуклеотид [25]. При этом для успешного прохождения сплайсинга, кроме соответствия консенсусу, для 5'сс важно соотношение количества связей данного сайта с U1 мРНК и U6 мРНК, т.к. последняя вытесняет первую из сплайсосомы в ходе формирования активного центра [24, 25].

На рис.3 видно, что в случае, если в позиции +4 находится U, пре-мРНК может в этом локусе сформировать 8 связей с U1 мРНК и 5 — с U6 мРНК, в случае C₊₄ количество связей — 8 и 4, соответственно. Таким образом, в случае IVS2(+4)c может быть затруднено вытеснение U1 мРНК из сплайсосомы, что будет способствовать пропуску соответствующего экзона.

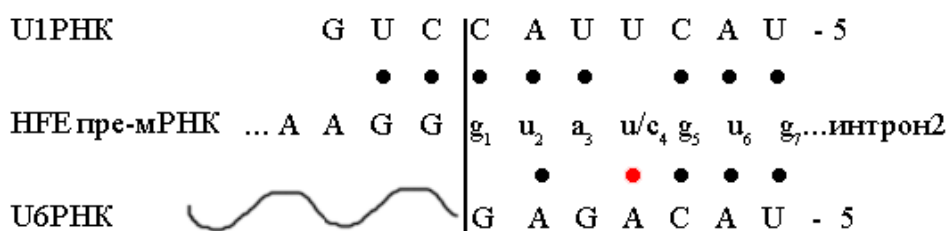


Рис.3 Схема РНК:РНК взаимодействий в ходе формирования сплайсосомы на границе 2 экзона и 2 интрона пре-м РНК гена HFE.

Среди изоформ HFE мРНК в GenBank, действительно, представлены несколько вариантов изоформ с пропуском 2 экзона: AJ249336, AF079408, AF079409, AJ249338, AJ249335.

Таблица 2. Нуклеотидные последовательности донорного сайта между 2-м экзоном и 2-м интроном у ортологов гена HFE

Виды	-5	-4	-3	-2	-1	1	2	3	4	5	6	7
Human	C	A	A	G	G	g	t	a	t/c	g	t	g
Rhesus	C	A	A	G	G	g	t	a	t	g	t	g
Mouse	T	A	A	G	G	g	t	a	c	g	t	g
Dog	C	A	A	G	G	g	t	a	c	g	g	g
Horse	C	A	A	G	G	g	t	a	c	g	t	g
Armadillo	C	A	A	G	G	g	t	g	c	g	t	g
Opossum	T	C	A	G	G	g	t	a	a	g	t	-
Platypus	C	G	A	G	G	g	t	g	t	g	t	g

Кроме того, наличие C₊₄ во 2-м интроне аллельных вариантов СТА и ССА — едва ли случайное событие, т.к. С также присутствует в этом локусе у большинства генов-ортологов HFE [27, 28] (табл. 2).

IVS4 (-44) t/c

4-й интрон гена HFE является классическим коротким интроном, он содержит значительное количество полипуриновых блоков, которые, как показано, являются потенциальными сайтами посадки различных белковых регуляторов сплайсинга [29].

Среди мРНК гена HFE с изменённым 4-м экзоном есть варианты, различающиеся расположением донорного сайта сплайсинга (AF150664) или наличием дополнительного короткого экзона (BC074721). Кроме того, в ходе контекстного анализа структуры 4-го интрона мы выявили две потенциальных изоформы, 5'сс которых соответствует консенсусу, и в их потенциальной экзонной части содержатся полипуриновые блоки (табл. 3).

Таблица 3. Реальные и потенциальные 5'-сайты сплайсинга вблизи 4-го экзона гена HFE. Позиции -1 сайтов пронумерованы относительно последовательности из GenBank accession no. Z92910, полиморфные сайты выделены жирным шрифтом.

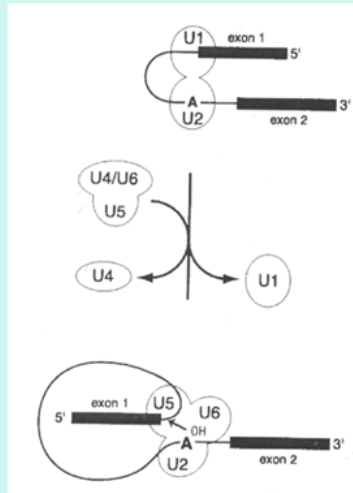
	Экзон					Интрон						
	-5	-4	-3	-2	-1	1	2	3	4	5	6	7
U60319	C	T	G	G	G 6769	g	t	a	t	g	t	g
AF150664	A	G	G	A	G 6835	g	t	a	a	t	t	a
BC074721	C/G (TTG2)	A	A	G	G 6450	g	t	a	a	a	c	a
Потенциальная изоформа 1	T/C (CCA)	G	A	G	G 6888	g	t	g	g	c	a	a
Потенциальная изоформа 2	T	G	G	G	G 6813	g	t	t	g/a (TTA)	a	g	a

Полиморфизм IVS4(-44) t/c находится в позиции -5 экзонной части одной из таких потенциальных изоформ РНК (потенциальная изоформа 1). Другой потенциальный 5'сс- мотив (потенциальная изоформа 2) находится в том же интроне на расстоянии 74 н.п. выше первого. Наличие нескольких подобных структур вблизи 4-го экзона может свидетельствовать о том, что в данном случае запрограммирован альтернативный сплайсинг с удержанием последовательностей 4-го интрона [30]. Все выявленные и потенциальные изоформы мРНК с модифицированным 4-м интроном кодируют укороченный белок HFE. Экспрессию HFE мРНК с удержанием 4-го интрона выявляли в печени пациентов с ГХ [18], кроме того, такой способ синтеза растворимого белка продемонстрирован для другого неклассического белка гистосовместимости HLA-G [16].

IVS5 (-47) g/a

Полиморфный сайт расположен внутри нуклеотидного блока GCAAGATG(G/A)TG, который гомологичен домену U6 мРНК, отвечающему за её взаимодействие с U4 мРНК [31]. Кроме того, этот же самый блок комплементарен фрагменту CAUCAGUUU U2 мРНК, расположенному на расстоянии 6 нуклеотидов ниже последовательности, взаимодействующей с брэнчпойнтом в интронах, при том, что классический брэнчпойнт в 5-м интроне отсутствует [26, 31]. Таким образом, данный блок нуклеотидов потенциально может выполнять двойную функцию, схема его участия в формировании сплайсосомы представлена на рис. 4.

U6 мяРНК 5'- GCAAG^GAUGA - 3'
 экзон 5 - gt-...-gcaagatg^{a/g}tg-...-аg экзон 6



экзон 5 - gt-...-gcaagatg^{a/g}tg-...-аg - экзон 6
 • • • • •
 U2 мяРНК 3' - ... - UUUGACUAC ... - 5'

Рис 4. Схема РНК:РНК взаимодействий в ходе сплайсинга последовательности 5-го интрона пре-мРНК гена HFE.

Подобная структура вблизи 3'сс может, с одной стороны, облегчать вытеснение U4 мяРНК из комплекса с U6 мяРНК и замещению её на U5 РНК, кроме того, может помочь сближению U2 РНК с пре-мРНК HFE, что в целом может повлиять на скорость формирования сплайсосомы [24, 25, 31].

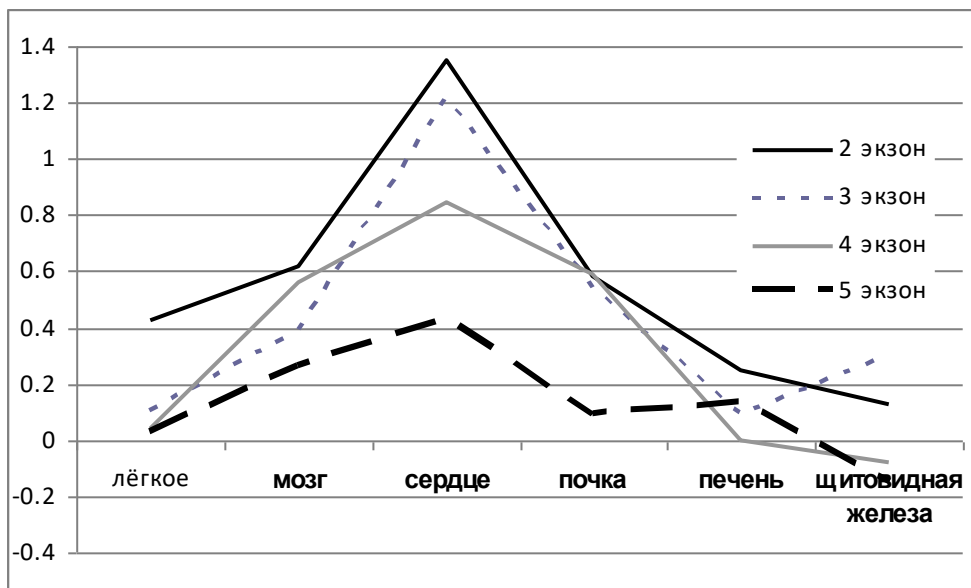


Рис. 5. Отклонение от среднего уровня экспрессии (логарифмическая шкала) 2-5 экзонов гена HFE в зависимости от типа ткани у человека. Данные взяты из Exon 1.0 ST Arrays (http://www.affymetrix.com/support/technical/sample_data/exon_array_data.affx).

Таким образом, участки расположения исследованных нами полиморфных сайтов потенциально могут быть задействованы на различных этапах сборки сплайсосом, а структурные изменения этих участков потенциально могут оказывать влияние на наличие и количество изоформ мРНК гена HFE.

В структуре гена HFE человека предусмотрена регуляция альтернативного сплайсинга, в том числе и тканеспецифическими факторами. На рис.5 приведены данные по гену из Exon 1.0 ST Arrays (http://www.affymetrix.com/support/technical/sample_data/exon_array_data.affx).

Видно, что в зависимости от типа ткани уровень экспрессии экзонов друг относительно друга может различаться. Возможно, мутации вблизи сайтов сплайсинга могут изменять в том числе и тканеспецифический профиль экспрессии гена.

Для оценки возможного влияния интронных гаплотипов на формирование патологического фенотипа мы исследовали их распространение в выборках пациентов с гемохроматозом (ГХ), синдромом перегрузки железом (СПЖ) и выборке долгожителей (ДЖ). Значительную часть пациентов в выборке с СПЖ составляли больные хроническими вирусными гепатитами С (24 чел.), В (5 чел.) или обоими (3 чел.). Результаты гаплотипического анализа приведены в табл.4.

Таблица 4. Распределение интронных гаплотипов среди пациентов с ГХ, СПЖ и ДЖ.

HFE генотип	Интронный гаплотип	Количество носителей		
		ГХ	СПЖ	ДЖ
C282Y/C282Y	TTG/TTG	4	0	0
H63D/H63D	CTA/CTA	1	2	2
C282Y/H63D	TTG/CTA	2	0	0
C282Y/WT	TTG/TTG	2	2	1
	TTG/TTA	0	0	1
	TTG/CTA	0	1	0
	TTG/CCA	0	0	0
H63D/WT	CTA/CCA	1	2	1
	CTA/CTA	0	1	1
	CTA/TTA	1	3	4
	CTA/TTG	2	12	6
S65C/WT	CCA/CTA	0	1	0
	CCA/TTG	0	2	0
	CCA/TTA	0	0	1
WT/WT	TTG/TTG	0	9	27
	TTG/TTA	0	9	10
	CCA/CCA	0	0	2
	CTA/CTA	0	1	0
	CTA/TTA	0	3	5
	TTA/TTA	0	1	3
	TTG/CTA	0	6	7
	CCA/TTA	0	0	5
TTG/CCA	0	1	3	
Общее число обследованных		13	55	79

При сравнении результатов проведённого гаплотипического анализа с полученными нами ранее популяционными данными по частотам гаплотипов гена HFE [32] было обнаружено, что между популяционной выборкой и выборкой ДЖ не наблюдается достоверной разницы в частотах гаплотипов, а у пациентов с СПЖ отмечено снижение

частоты гаплотипа ССА. Результаты сравнения частот интронных гаплотипов гена HFE приведены в табл.5.

Таблица 5. Частоты аллелей гена HFE в популяционной выборке русских г. Новосибирска [31], выборках долгожителей и пациентов с ГХ и СПЖ.

Аллели гена HFE	Популяция	ГХ	СПЖ	ДЖ
TTG(WT)	0.47	0.15	0.44	0.51
TTG3 (C282Y)	0.03	0.46	0.03	0.01
СТА(WT)	0.13	0	0.12	0.08
СТА1 (H63D)	0.13	0.31	0.20	0.10
ССА(WT)	0.08	0.04	0.03	0.08
ССА(S65C)	0.02	0	0.02	0.01
ТТА	0.14	0.04	0.15	0.20

В ходе генотипирования расширенной выборки ДЖ (258 чел.) по полиморфизму IVS4(-44) t/c, являющемуся определяющим для гаплотипа ССА, было обнаружено, что его частота составляет 0.11 ± 0.01 .

На выборке из 131 здоровой женщины г. Новосибирска нами была оценена зависимость биохимических показателей железа крови от генотипа по сайту IVS4(-44). Достоверной разницы по показателям железа между носителями различных генотипов найдено не было. Это может свидетельствовать о том, что полиморфизм IVS4(-44)t проявляется фенотипически только в случае влияния определённых факторов внешней среды, в том числе при развитии некоторых заболеваний.

Таким образом, в ходе анализа интронных полиморфизмов IVS2(+4)t/c, IVS4(-44)t/c, и IVS5(-47)a/g гена HFE в популяционных выборках различных этнических групп России обнаружено только 4 из 8 потенциально возможных интронных гаплотипов: ТТА, СТА, TTG и ССА. Установлено, что в популяционных выборках России мутации С282Y, H63D и S65C этого гена сцеплены с гаплотипами TTG, СТА и ССА соответственно.

Методом контекстного анализа ДНК показана возможность влияния полиморфизмов в позициях IVS2(+4), IVS4(-44) и IVS5(-47) гена HFE на сплайсинг пре-мРНК. Обнаружено достоверное снижение ($\chi^2=6.335$, $p=0.012$) частоты гаплотипа ССА в выборке пациентов с СПЖ относительно популяционной выборки и выборки долгожителей и, следовательно, показано косвенное влияние IVS4(-44)t на формирование патологического фенотипа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Feder J.N., Gnirke A., Thomas W., Tsuchihashi Z., Ruddy D.A., Basava A., Dormishian F., Domingo R. Jr, Ellis M.C., Fullan A., Hinton L.M., Jones N.L., Kimmel B.E., Kronmal G.S., Lauer P., Lee V.K., Loeb D.B., Mapa F.A., McClelland E., Meyer N.C., Mintier G.A., Moeller N., Moore T., Morikang E., Prass C.E., Quintana L., Starnes S.M., Schatzman R.C., Brunke K.J., Drayna D.T., Risch N.J., Bacon B.R., Wolff R.K. *Nature Genetics*. 1996. V. 13. P. 399–408.
2. Lebron J.A., Bennett M.J., Vaughn D.E., Chirino A.J., Snow P.M., Mintier G.A., Feder J.N., Bjorkman P.J. *Cell*. 1998. V. 93. P. 111–123.
3. Lieu P.T., Heiskala M., Peterson P.A., Yang Y. *Mol Aspects Med*. 2001. V. 22. P. 1–87.
4. Gross C.N., Irrinki A., Feder J.N., Enns C.A. *J Biol Chem*. 1998. V. 273. P. 22068–22074.

5. Waheed A., Grubb J.H., Zhou X.Y., Tomatsu S., Fleming R.E., Costaldi M.E., Britton R.S., Bacon B.R., Sly W.S. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002. V. 99. P. 3117–3122.
6. Nicolas G., Bennoun M., Devaux I., Beaumont C., Grandchamp B., Kahn A., Vaulont S. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001. V. 98. P. 8780–8785.
7. Ahmad K.A., Ahmann J.R., Migas M.C., Waheed A., Britton R.S., Bacon B.R., Sly W.S., Fleming R.E. *Blood Cells Mol Dis*. 2002. V. 29. P. 361–366.
8. Bridle K.R., Frazer D.M., Wilkins S.J., Dixon J.L., Purdie D.M., Crawford D.H., Subramaniam V.N., Powell L.W., Anderson G.J., Ramm G.A. *Lancet*. 2003. V. 36. P. 669–673.
9. Gehrke S.G., Herrmann T., Kulaksiz H., Merle U., Bents K., Kaiser I., Riedel H.D., Stremmel W. *Digestion*. 2005. V. 72. P. 25–32.
10. Makui H., Soares R.J., Jiang W., Constante M., Santos M.M. *Blood*. 2005. V. 106. P. 2189–2195.
11. Goswami T., Andrews N.C. *J Biol Chem*. 2006. V. 281. P. 28494–28498.
12. Rohrllich P.S., Fazilleau N., Ginhoux F., Firat H., Michel F., Cochet M., Laham N., Roth M.P., Pascolo S., Nato F., Coppin H., Charneau P., Danos O., Acuto O., Ehrlich R., Kanellopoulos J., Lemonnier F.A. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005. V. 102. P. 12855–12860.
13. de Almeida S.F., Carvalho I.F., Cardoso C.S., Cordeiro J.V., Azevedo J.E., Neefjes J., de Sousa M. *Blood*. 2005. V. 106. P. 971–977.
14. Ishitani A., Geraghty D.E. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992. V. 89. P. 3947–3951.
15. Kirszenbaum M., Moreau P., Gluckman E., Dausset J., Carosella E. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994. V. 91. P. 4209–4213.
16. Fujii T., Ishitani A., Geraghty D.E. *J Immunol*. 1994. V. 153. P. 5516–5524.
17. Thenie A., Orhant M., Gicquel I.M., Fergelot P., Le Gall J-Y., David V., Mosser J. *Blood Cells Mol Dis*. 2000. V. 26. P. 155–162.
18. Jeffrey G.P., Basclain K., Hajek J., Chakrabarti S., Adams P.C. *Blood Cell Mol Dis*. 1999. V. 25. P. 61–67.
19. Rhodes D.A., Trowsdale J. *Immunogenetics*. 1999. V. 49. P. 357–359.
20. Sánchez M., Bruguera M., Rodés J., Oliva R. *Blood Cell Mol Dis*. 2001. V. 27. P. 35–43.
21. Toomajian C., Kreitman M. *Genetics*. 2002. V. 161. P. 1609–1923.
22. Felsenstein J. *Cladistics*. 1989. V. 5. P. 164–166.
23. Rogozin I.B., Milanese L. *J Mol Evol*. 1997. V. 45. P. 50–59.
24. Nagai K., Muto Y., Pomeranz Krummel D.A., Kambach C., Ignjatovic T., Walke S., Kuglstatler A. *Biochem Soc Transactions*. 2001. V. 29. P. 15–26.
25. Lund M., Kjems J. *RNA*. 2002. V. 8. P. 166–179.
26. Carmel I., Tal S., Vig I., Ast G. *RNA*. 2004. V. 10. P. 828–840.
27. Kent W.J., Sugnet C.W., Furey T.S., Roskin K.M., Pringle T.H., Zahler A.M., Haussler D. *Genome Res*. 2002. V. 12. P. 996–1006.
28. Karolchik D., Kuhn R.M., Baertsch R., Barber G.P., Clawson H., Diekhans M., Giardine B., Harte R.A., Hinrichs A.S., Hsu F., Kober K.M., Miller W., Pedersen J.S., Pohl A., Raney B.J., Rhead B., Rosenbloom K.R., Smith K.E., Stanke M., Thakkapallayil A., Trumbower H., Wang T., Zweig A.S., Haussler D., Kent W.J. *Nucleic Acids Res*. 2007. V. 36. Database issue. P. D773–D 779.
29. McCullough A.J., Berget S.M. *Mol Cell Biol*. 1997. V. 17. P. 4562–4571.
30. Galante P.A.F., Sakabe N.J., Kirschbaum-Slager N., de Souza S.J. *RNA*. 2004. V. 10. P. 757–765.
31. Guthrie C., Patterson B. *Annu Rev Genet*. 1988. V. 22. P. 387–419.
32. Михайлова С.В., Онопченко О.В., Суханов А.В., Максимов В.Н., Гаскина Т.К., Ромащенко А.Г., Воёвода М.И. *Вестник ВОГИС*. 2006. Т. 10. С. 504–513.

Материал поступил в редакцию 14.11.2008, опубликован 01.12.2008.