

Полиморфизм rs1800497 гена ANKK1: новый способ детекции

Фирсова Наталья Евгеньевна,

магистрант 2 курса, естественно-географический факультет, ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный педагогический университет имени И. Н. Ульянова»,

г. Ульяновск, Россия;

Баранов Александр Валерьевич,

магистрант 1 курса, естественно-географический факультет, ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный педагогический университет имени И. Н. Ульянова»,

г. Ульяновск, Россия;

Соловьев Алексей Вячеславович,

кандидат биологических наук, доцент кафедры биологии и химии, ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный педагогический университет имени И. Н. Ульянова»,

г. Ульяновск, Россия;

Антонова Елена Ивановна,

доктор биологических наук, профессор кафедры биологии и химии, ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный педагогический университет имени И.Н. Ульянова»,

г. Ульяновск, Россия.

Аннотация. Для выявления полиморфизма rs1800497 гена ANKK1, ассоциированного с девиантным поведением (алкоголизмом, наркоманией,

табакокурением), неврологическими и психическими заболеваниями, разработан простой и быстрый способ его детекции, основанный на ПЦР-РВ (полимеразная цепная реакция с детекцией «в режиме реального времени») с использованием интеркалирующих красителей.

Ключевые слова: генетика поведения, ANKK1, rs1800497, генотипирование, ПЦР-РВ

Настоящая статья посвящена разработке оригинального способа детекции полиморфизма гена ANKK1, известного как *TaqIA* или rs1800497 (нуклеотидная замена с.2137G>A), где идентификационный номер «rs» соответствует номеру референсной последовательности полиморфизма в базе данных dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>).

Следует отметить, что в течение длительного времени полиморфизм rs1800497 относили к гену DRD2 (D2 рецептор дофамина), однако в 2004 году [15] показано, что полиморфизм относится к гену ANKK1 (“ankyrin repeat and kinase domain containing 1”). Ген ANKK1 располагается в регуляторной зоне гена DRD2 и регулирует его экспрессию. Ген DRD2 кодирует рецептор дофамина – белок, располагающийся на поверхности нейронов, сопряженный с G-белками и запускающий каскад реакций внутри клетки под воздействием дофамина – «гормона удовольствия» [15]. Нарушение работы дофаминергической системы ассоциировано с неврологическими и психическими заболеваниями.

Полиморфный сайт rs1800497 расположен ниже 3`-конца гена DRD2 на расстоянии около 10 000 пар оснований и локализован в последнем экзоне гена ANKK1; нуклеотидная замена с.2137G>A приводит к аминокислотной замене Glu713Lys в 11-м анкириновом повторе.

Согласно базы данных dbSNP (дата обращения: 09.03.2018), ген ANKK1

имеет 570 описанных полиморфизмов (включая синонимичные), среди которых наибольшее значение имеет полиморфизм rs1800497.

Впервые связь полиморфизма rs1800497 с алкоголизмом была выявлена в 1990 году Бламом с соавторами [9], где исследователями также предложен способ детекции, основанный на подходе RFLP (англ. “Restriction Fragment Length Polymorphism” – полиморфизм длин фрагментов рестрикции). Анализируемый полиморфный сайт приходится на сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции *TaqI* (нуклеотидная последовательность сайта: TCGA). Аллель С содержит данный сайт узнавания, а аллель Т, соответствующая полиморфизму rs1800497 – нет. В связи с этим другое название полиморфизма rs1800497 – *TaqIA*.

В настоящее время отмечена связь полиморфизма с девиантным поведением, предрасположенностью к алкоголизму, наркомании, табакокурению, развитию психозов, шизофрении и маниакально-депрессивным расстройствам, болезнью Паркинсона, двигательным расстройствам, мигрени и т.д. [1, 2, 4, 5, 7, 8, 11, 14, 16, 17]. Это связано с тем, что при наличии полиморфизма rs1800497 (аллель Т) происходит уменьшение плотности D2-дофаминовых рецепторов во всех областях полосатого тела головного мозга [17]. Также выявлена зависимость полиморфизма rs1800497 с вариантами гена FTO (“Fat mass and obesity-associated protein”), при этом может быть повышен риск ожирения и развития диабета [13].

Изучение полиморфизма также важно в аспекте развития персонализированной медицины, и полиморфизм связан с реакцией на лекарственные препараты, в том числе антипсихотические, и полиморфизм должен учитываться при назначении лечения [3, 10, 18].

Частота встречаемости минорного аллеля (Т) по разным оценкам составляет от 0,2354 до 0,3257 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1800497). У населения

России встречаемость аллеля по разным данным и регионам составляет от 0,154 (Смоленская и Курская области) до 0,262 (Архангельская область) [19, 21, 12].

В настоящее время для выявления полиморфизма rs1800497 используются подходы RFLP [4] и ПЦР-РВ с использованием ДНК-зондов [2, 6, 20], а также секвенирование. Задача, решаемая нами в исследовании – разработка экономичного и быстрого способа выявления полиморфизма, основанного на возможности детекции результатов аллель-специфичной ПЦР электрофоретически и в режиме реального времени, в зависимости от имеющегося оборудования, без использования модифицированных олигонуклеотидов в составе тест-системы, а также апробация данного способа.

Материалы и методы

В качестве референсной последовательности для дизайна праймеров аллель-специфичной ПЦР использовалась последовательность NG_012976.1, заимствованная из базы данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Дизайн праймеров проводился с использованием программного обеспечения Unipro UGENE v1.29.0. Анализ праймеров, расчёт температуры плавления, анализ вторичных структур выполнялись с помощью ресурса OligoAnalyzer 3.1 (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>).

Синтез праймеров осуществлялся с помощью синтезатора ДНК/РНК ASM-800 (Биоссет, Россия).

Для проведения полимеразной цепной реакции использовалась SNP-detect полимеразы (Евроген, Россия) согласно инструкции производителя; в качестве интеркалятора для ПЦР-РВ – краситель Sybr Green I.

В качестве матрицы для апробации и оптимизации тест-системы использовалась кровь, фиксированная в ЭДТА, от пациентов с повышенным

содержанием (>1,3%) карбогидрат-дефицитного трансферрина (CDT) – маркера хронического алкоголизма; повышение уровня данного маркера свидетельствует о частом употреблении алкоголя. Выделение ДНК из цельной крови (200 мкл) проводилось с использованием коммерческого набора GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit (Thermo Fisher Scientific) согласно инструкции производителя; объём элюции – 100 мкл.

ПЦР проводилась с использованием детектирующего амплификатора qTower 2.2 (Analytik Jena, Германия), анализ результатов ПЦР-РВ выполнялся с помощью программного обеспечения qPCRsoft 3.0 (Analytik Jena, Германия).

Гель-электрофорез проводился в 1% агарозном геле при напряжении 100 В с использованием установки для горизонтального гель-электрофореза Biometra (Германия); электрофорезный буфер – однократный ТАЕ. Система гель-документации: BioDocAnalyze (Analytik Jena, Германия). Маркер длин – GeneRuler Low Range DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Работа выполнена на базе Научно-исследовательского центра фундаментальных и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «УлГПУ им. И.Н. Ульянова».

Результаты

Дизайн праймеров аллель-специфичной ПЦР, лежащей в основе предлагаемого метода выявления полиморфизма, осуществлялся исходя из критериев: температура плавления аллель-специфичных праймеров должна быть около 65°C, при этом должна быть на несколько градусов меньше температуры плавления универсального праймера; минимизация вторичных структур у праймеров и минимизация получения праймер-димеров; полиморфный сайт должен приходиться на 3'-конец аллель-специфичных праймеров.

Структура сконструированных аллель-специфичных праймеров:

DRDTaqR_C: CCATCCTCAAAGTGCTGGTCG (аллель С);

DRDTaqR_T: CCATCCTCAAAGTGCTGGTCA (аллель Т).

Структура универсального праймера [4]:

DRDTaqF: CCACGGCTGGCCAAGTTGTC.

Фланкируемая праймерами область составляет 200 пар оснований, что является наиболее оптимальным для возможности осуществления электрофоретической детекции.

Состав реакционной ПЦР-смеси: реакционный буфер с магнием – 1х (концентрация Mg^{2+} – 2,5 мМ), праймеры – по 0,2 мкМ, дезоксинуклеотидтрифосфаты – по 10 мМ; полимеразы SNP-detect (Евроген) – 0,1 ед./мкл; Sybr Green – 1х; матрица ДНК – 10% от объёма реакционной смеси.

Для изучения одного генотипа необходима постановка двух реакций, для выявления аллеля С и Т, соответственно. Объём реакционной смеси одной реакции – 20 мкл.

Параметры проведения ПЦР: (1) 95°C – 3'; (2) 95°C – 20''; (3) 65°C – 30''; (4) 72°C – 25''; повторение 2–4 этапов – 45 циклов; (5) 72°C – 5'. Детекция по каналу FAM на 3-м этапе каждого цикла.

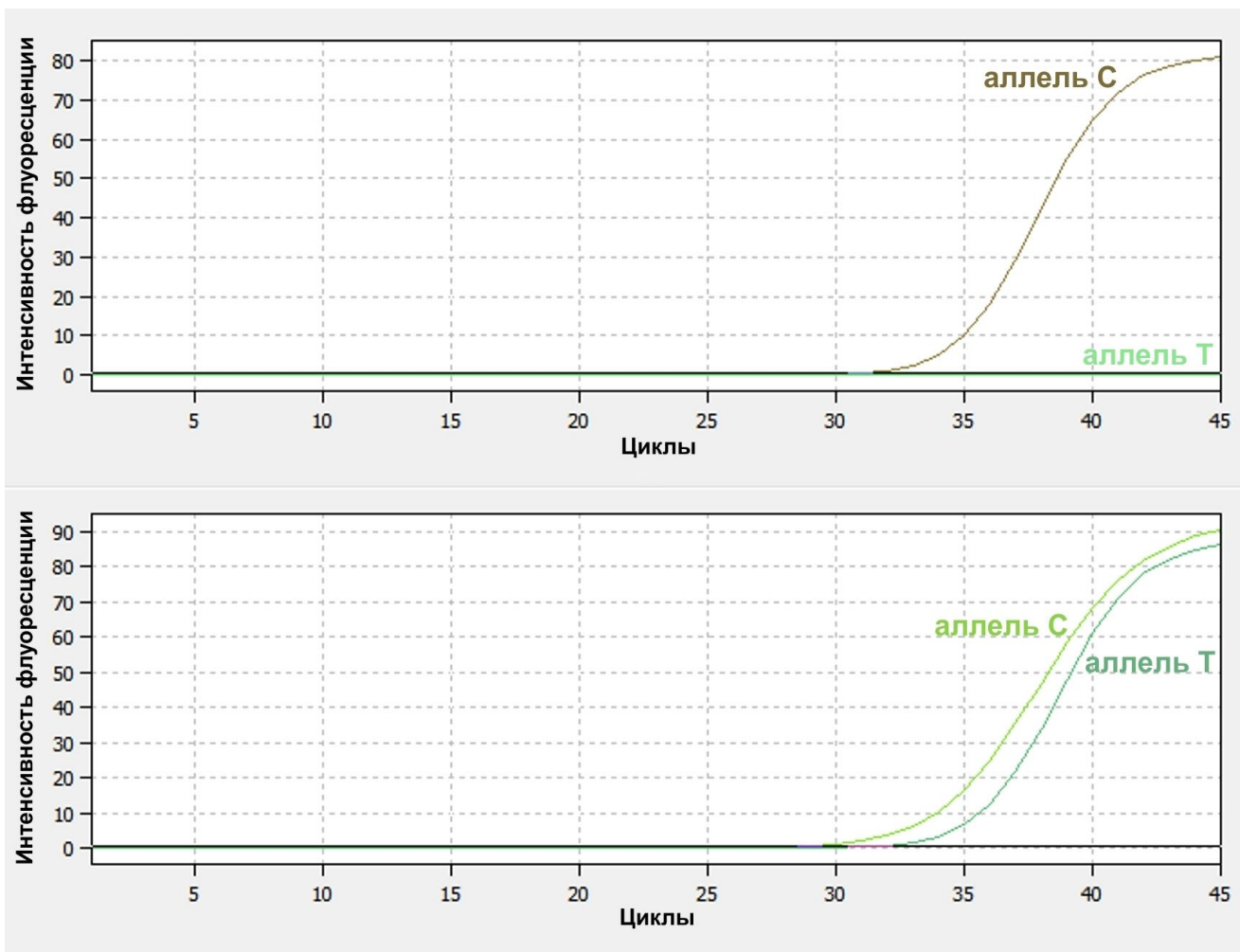


Рис. 1. Результаты ПЦР-РВ: графики уровня флуоресценции по каналу FAM. Верхний рисунок: гомозиготное состояние, вариант rs1800497 (аллель Т) не выявлен. Нижний рисунок: гетерозиготное состояние, вариант rs1800497 выявлен.

Результаты ПЦР-РВ представлены на рис. 1. Значения порогового цикла (Ct) получены при значении порога ("threshold") – 0,5. Для аллель-специфичной реакции для выявления аллеля С диапазон значений Ct составил от 26,6 до 30,81 (среднее значение – 29,08), а для аллеля Т – от 29,08 до 32,22 (среднее значение – 30,87) (таблица 1). Из исследуемых генотипов 6-ти пациентов во всех случаях выявлен аллель С, и лишь у трёх – также аллель Т, что свидетельствует о гетерозиготном состоянии гена ANKK1 по изучаемому полиморфизму.

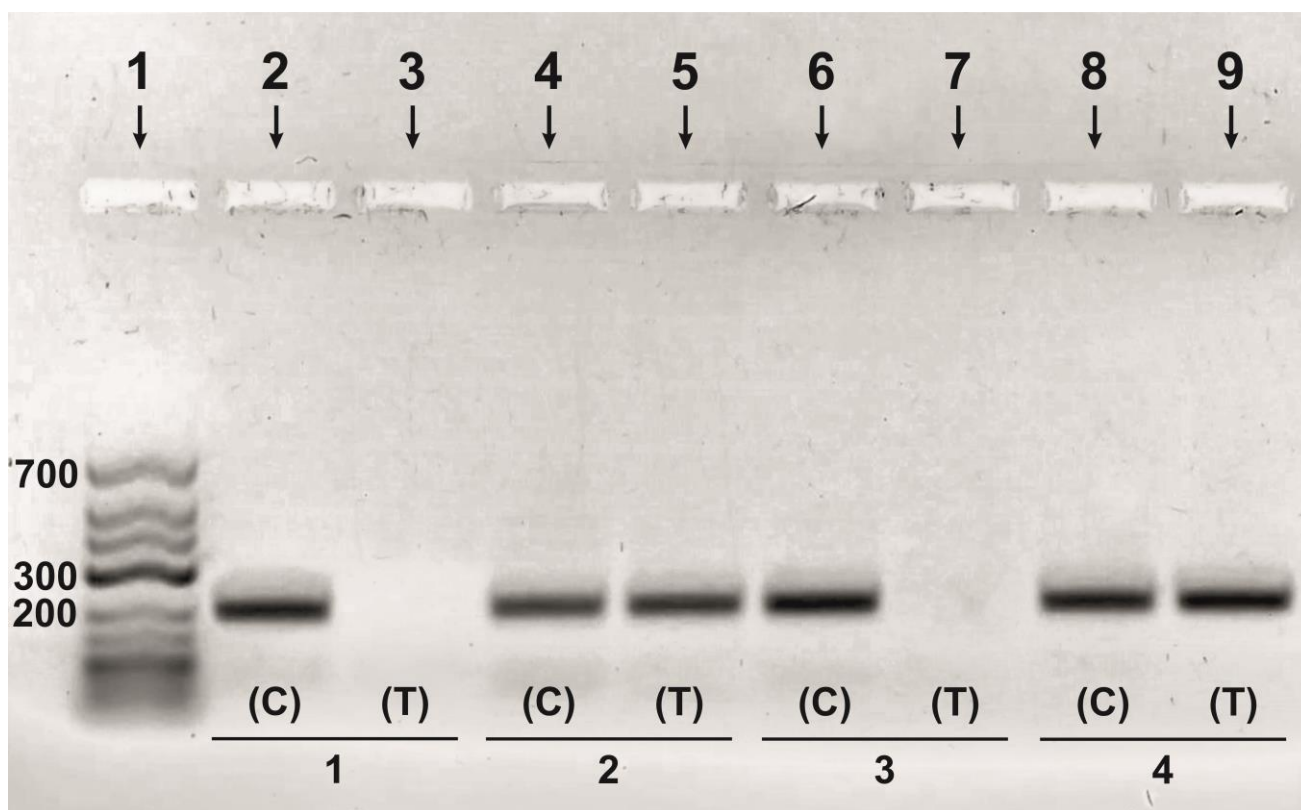


Рис. 2. Результаты электрофоретической детекции продуктов амплификации. Лунка 1: маркер длин: 700, 500, 400, 300, 200, 150, 100, 75, 50, 25 пар оснований. Лунки 2–9: пациенты 1–4 (подписи под чертой). Обозначения «С» и «Т» указывают выявляемый целевой аллель гена ANKK1. Результаты: пациенты 1 и 3: гомозиготное состояние, вариант rs1800497 (аллель Т) не выявлен; пациенты 2 и 4: гетерозиготное состояние, вариант rs1800497 (аллель Т) выявлен.

Продукты реакций были проанализированы электрофоретически (рис. 2). На электрофореграммах отмечено наличие специфического продукта реакции длиной около 200 пар оснований со слабо выраженными областями шмер в области до 100 пар оснований, что в целом свидетельствует о специфичности разработанной тест-системы для выявления полиморфизма rs1800497. Преимуществами разработанного способа выявления полиморфизма rs1800497 являются быстрота и экономичность, а также возможность разных типов детекции – с помощью детектирующего амплификатора и, при отсутствии такого, с помощью проведения гель-электрофореза.

Таблица 1

Интерпретация результатов ПЦР-РВ

Шифр пациента	Аллель	Значение Ct	Результат
1	С	28,68	гомозигота
1	Т	—	
2	С	29,26	гетерозигота
2	Т	32,22	
3	С	26,66	гомозигота
3	Т	—	
4	С	28,77	гетерозигота
4	Т	31,32	
5	С	30,29	гетерозигота
5	Т	29,08	
6	С	30,81	гомозигота
6	Т	—	

Библиографический список

1. Барский В. И., Аксенова М. Г., Козлова О. Б., Кириллов А. В., Демин А. А., Ильиных Л. М., Рапопорт И. К., Асанов А. Ю. Анализ ассоциаций полиморфных маркеров генов дофаминергической (DRD2/ANKK1) и серотонинергической (HTR2A) систем мозга с личностными характеристиками подростков // Экологическая генетика. 2010. Т. 8, № 2. С. 9–17.
2. Голимбет В. Е., Лебедева И. С., Монахов М. В., Коровайцева Г. И., Лежейко Т. В., Абрамова Л. И., Каледа В. Г., Карпов В. Л. Аллель Cys (полиморфизм Ser311Cys) гена рецептора дофамина D2 связан с шизофренией и нарушением избирательного внимания у больных // Журнал неврологии и психиатрии. 2009. Т. 9. С. 67–70.
3. Застрожин М. С., Сычев Д. А., Гришина Е. А., Савченко Л. М., Брюн Е. А. Фармакодинамические полиморфизмы генов и нежелательные побочные реакции при применении антипсихотических лекарственных средств // World Journal of Personalized Medicine. 2017. № 1 (1). С. 5–12.
4. Кибитов А. О., Воскобоева Е. Ю., Моисеев И. А., Шамакина И. Ю., Анохина И. П. Полиморфизм генов дофаминовых рецепторов у больных алкоголизмом и героиновой наркоманией // Журнал «НАРКОЛОГИЯ». 2007. № 4. С. 31–38.
5. Кибитов А. О., Воскобаева Е. Ю., Бродянский В. М., Чупрова Н. А., Смирнова Е. В. Молекулярно-генетический анализ наследственной отягощенности по алкоголизму у наркотических больных: полиморфизм гена дофаминового рецептора типа 2 (DRD2) // Клиническая наркология. 2009. №9. С. 53–63.
6. Колупаев В. Е. Преимущества метода ПЦР в реальном времени (Real Time PCR) // Лабораторная медицина. 2002. № 5. С. 110–112.

7. Шнайдер Л. Б. Девиантное поведение детей и подростков. М.: Академический проект. Трикста, 2007. 336 с.

8. Blum K., Braverman E. R., Holder J. M. Reward deficiency syndrome: a biogenetic model for the diagnosis and treatment of impulsive, addictive, and compulsive behaviors // *Journal of Psychoactive Drugs*. 2000. Vol. 32. P. 1–112.

9. Blum K., Noble E. P., Sheridan P. J., Montgomery A., Ritchie T., Jagadeeswaran P., Nogami H., Briggs A. H., Cohn J. B. Allelic Association of Human Dopamine D2 Receptor Gene in Alcoholism // *JAMA*. 1990. Vol. 263, No. 15. P. 2055–2060.

10. Bueno C., Trarbach E. B., Bronstein M.D., Glezer A. Cabergoline and prolactinomas: lack of association between DRD2 polymorphisms and response to treatment // *Pituitary*. 2017. Vol. 20(3). P. 295–300.

11. Dick D. M., Wang J. C., Aliev F. Family-based association analyses of alcohol dependence phenotypes across DRD2 and neighboring gene ANKK1 // *Alcoholism Clinical and Experimental Research*. 2007. Vol. 37 (10). P. 1645–1653.

12. Flegontova O. V., Khrunin A. V., Lylova O. I., Tarskaia L. A., Spitsyn V. A., Mikulich A. I., Limborska S. A. Haplotype frequencies at the DRD2 locus in populations of the East European Plain // *BMC Genetics*. 2009. Vol. 10:62. URL: <https://bmcgenet.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2156-10-62>.

13. Heni M., Kullmann S., Ahlqvist E., Wagner R., Machicao F., Staiger H., Hdring H. U., Almgren P., Groop L. C., Small D. M., Fritsche A., Preissl H. Interaction between the obesity-risk gene FTO and the dopamine D2 receptor gene ANKK1/TaqIA on insulin sensitivity // *Diabetologia*. 2016. Vol. 59 (12). P. 2622–2631.

14. Jonsson E. G., Nathen M. M., Grunhage F. Polymorphisms in the dopamine

D2 receptor gene and their relationships to striatal dopamine receptor density of healthy volunteers // *Molecular Psychiatry*. 1999. Vol. 4(3). P. 290–296.

15. Neville M. J., Johnstone E. C., Walton R. T. Identification and characterization of ANKK1: a novel kinase gene closely linked to DRD2 on chromosome band 11q23.1 // *Human Mutation*. 2004. Vol. 23(6). P.540–545.

16. Noble E. P. Addiction and its reward process through polymorphisms of the D2 dopamine receptor gene: a review // *European Psychiatry*. 2000. Vol. 15 (2). P. 79–89.

17. Noble E. P. D2 dopamine receptor gene in psychiatric and neurologic disorders and its phenotypes // *American Journal of Medical Genetics Part B (Neuropsychiatric Genetics)*. 2003. Vol. 116B. P. 103–125.

18. Nuntamool N., Ngamsamut N., Vanwong N., Puangpetch A., Chamnanphon M., Hongkaew Y., Limsila P., Suthisang C., Wilffert B., Sukasem C. Pharmacogenomics and Efficacy of Risperidone Long-Term Treatment in Thai Autistic Children and Adolescents // *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2017. Vol. 121 (4). P. 316–324.

19. Osier M. V., Cheung K. H., Kidd J. R., Pakstis A. J., Miller P. L., Kidd K. K. ALFRED: an allele frequency database for Anthropology // *American Journal of Physical Anthropology*. 2002. Vol. 119. P. 77–83.

20. Paik S. H., Choi M. R., Kwak S. M., Bang S. H., Chun J. W., Kim J. Y., Choi J., Cho H., Jeong J. E., Kim D. J. An association study of Taq1A ANKK1 and C957T and - 141C DRD2 polymorphisms in adults with internet gaming disorder: a pilot study // *Annals of General Psychiatry*. 2017. Vol. 16:45.

21. Rajeevan H., Osier M.V., Cheung K.H., Deng H., Druskin L., Heinzen R., Kidd J. R., Stein S., Pakstis A. J., Tosches N. P., Yeh C. C., Miller P. L., Kidd K. K. ALFRED – the ALlele FREquency Database – update // *Nucleic Acids Research*. 2003. Vol. 31 (1). P. 270–271.