

ВЛИЯНИЕ Alu-ИНСЕРЦИЙ НА МЕТАБОЛИЗМ ЛИПИДОВ

© 2011 И.В. Николаев, Л.Р. Каюмова, Г.Р. Гумерова, Е.В. Воробьева, В.Ю. Горбунова

ГОУ ВПО «Башкирский государственный педагогический университет им. М. Акмуллы», г. Уфа

Поступила 05.07.2011

Рассмотрено влияние трех Alu-инсерций (в генах *ACE*, *ABCA6* и *ABCA10*) на процесс метаболизма липидов в организме человека. Проведен поиск ассоциаций частот аллелей и генотипов генов, содержащих инсерции Alu-элементов, с такими параметрами липидного профиля, как уровень общего холестерина, уровень триглицеридов, уровень липопротеинов низкой плотности, уровень липопротеинов высокой плотности, а также индекс атерогенности.

Ключевые слова: инсерция, метаболизм липидов, Alu-элемент, индекс атерогенности.

Alu-элементы – короткие диспергированные повторяющиеся последовательности ДНК, доля которых в геноме человека составляет около 10.6% от объема [2]. Длина типичного Alu-элемента около 300 пар нуклеотидов. «Современные» Alu-повторы классифицируют в соответствии с их возрастом. Выделяют 3 основных субсемейства Alu: Alu J, Alu S, Alu Y. Считается, что Alu Y — самое «молодое» субсемейство, средний возраст его представителей около 5 млн лет. Они до сих пор активны в отдельных семействах человекообразных приматов и потому полиморфны. В геноме человека большая часть Alu-инсерций приходится именно на субсемейство AluY или его производные. Из них наиболее представлены AluYa5 и AluYb8 подсемейства [2, 3]. В настоящее время ведется активный поиск Alu-элементов, которые могут быть задействованы в развитии тех или иных физиологических и психических признаков человека, а также их нарушений [5]. Ряд свойств полиморфных Alu-локусов, такие как их повсеместная распространенность в геноме, известное направление мутации, легкость генотипирования, делают их очень удобными генетическими маркерами [3, 4]. В данной работе поставлена цель изучить возможное влияние трех Alu-инсерций (в гене ангиотензин-превращающего фермента *ACE*, в генах АТФ-связывающих кассетных транспортеров субсемейства А: *ABCA6* и *ABCA10*) на метаболизм липидов в организме человека и на параметры липидного профиля.

Ангиотензин-превращающий фермент представляет собой интегральный мембранный полипептид длиной 1306 АК, являющийся одним из ключевых компонентов ренин-ангиотензиновой системы, отвечающей за превращение ангиотензина I в ангиотензин II, являющийся основным сосудосуживающим агентом. Участвует в поддержании водно-солевого гомеостаза организма, питания и

стимуляции клеток гладкой мускулатуры сосудов и миокарда. Ген *ACE* картирован на хромосоме 17 (17q23), содержит 26 экзонов и 25 интронов. В 16 интроне гена находится полиморфный Alu-элемент *Ya5NBC102* [15, 18].

АТФ-связывающие кассетные транспортеры (АВС), к которым относятся *ABCA6* и *ABCA10*, образуют одно из самых крупных и самых консервативных суперсемейств трансмембранных белков, встречающихся во всех живых организмах. Исходя из структурного сходства и гомологии последовательностей, эукариотические АВС-белки разделяют на 8 различных подсемейств (от *ABCA* до *ABCH*), 7 из которых (от *ABCA* до *ABCG*) представлены в геноме человека [10, 17]. Большинство АТФ-связывающих кассетных транспортеров участвует в АТФ-зависимом переносе различных молекул, таких как аминокислоты, сахара и липиды через биологические мембраны [9, 10, 17]. Они осуществляют свое действие благодаря наличию в своем составе специфических сайтов, позволяющих осуществлять транспорт через мембрану клетки. Между собой АВС-транспортеры различаются трансмембранными доменами, в то время как АТФ-связывающие домены являются высококонсервативной структурой, гомологичной для всех белков этого типа [14].

Гены *ABCA6* и *ABCA10* локализованы на 17 хромосоме в локусе q24.2-3, входят в состав уникального кластера генов АТФ-связывающих кассетных транспортеров человека, расположенного на 17 хромосоме и включающего в себя гены *ABCA5*, *ABCA6*, *ABCA8* и *ABCA9* и *ABCA10* [20]. Размер гена *ABCA6* около 62 kb, состоит из 39 экзонов и 38 интронов. Экспрессируется повсеместно, но более всего в печени, легких, сердце. В 25 интроне этого гена располагается Alu-элемент *Ya5_435* [18]. Белок *ABCA6* представляет собой полипептид из 1617 аминокислот [11, 20]. Исходя из особенностей строения, предполагают, что *ABCA6* также задействован в поддержании липидного гомеостаза посредством макрофагов [8]. В состав гена АТФ-связывающего кассетного транспортера *ABCA10* входят 39 интронов и 40 экзонов, размер составляет около 97 kb. Топология его экспрессии совпадает с таковой у *ABCA6*. Белковый

Николаев Иван Владиславович, e-mail: nikolaev.i.86@gmail.com; Каюмова Лилия Рашиевна, e-mail: kayumovalr@mail.ru; Гумерова Гузель Рифовна, e-mail: gumerovagr@yandex.ru; Воробьева Елена Владимировна, канд. биол. наук, e-mail: vorobyevaev@rambler.ru; Горбунова Валентина Юрьевна, докт. биол. наук, проф., e-mail: obg_bspu@mail.ru

продукт гена состоит из 1543 аминокислот и имеет высокую гомологию с аминокислотной последовательностью кассетного транспортера ABCA6 [19]. Свойства и роль АТФ-связывающих кассетных переносчиков ABCA6 и ABCA10 изучены недостаточно.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

При изучении инсерционно-делеционного полиморфизма локусов, содержащих Alu-элементы *Ya5NBC102*, *Ya5_435*, *Yb8NBC48*, обследованы 316 человек в возрасте от 18 до 65 лет, проживающие на территории РБ. По показаниям липидного профиля они разделены на группы, в соответствии с рекомендациями Комитета экспертов Всероссийского научного общества кардиологов, составленные с учетом Европейских рекомендаций III пересмотра, 2003 г.: значения уровня общего холестерина (ОХС) выше 5.2 ммоль/л (N=51) считали высокими, ниже этого значения – нормой (N=265); значения уровня триглицеридов (ТГ) более 1.7 ммоль/л считали высокими (N=38), ниже – нормой (N=278); значения уровня липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) более 3.35 ммоль/л считали высокими (N=35), ниже этого значения – нормой (N=281); низкий уровень ЛПВП считали таковым,

если он был ниже 0.9 ммоль/л (N=36), уровень липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) от 0.9 до 1.8 ммоль/л (N=216) определяли как норму, уровень ЛПВП более 1.8 ммоль/л считали высоким (N=64).

Для определения концентрации ОХС, ТГ, ЛПВП в плазме крови использовали наборы фирмы «Вектор-Бест» (Новосибирск). Концентрацию ЛПНП рассчитывали по формуле Фридвальда: ЛПНП=ОХС-ЛПВП-ТГ /2,2 [6]. Для расчета повышенного риска развития атеросклероза и заболеваний сердечно-сосудистой системы рассчитывали индекс атерогенности (ИА) по формуле Климова: ИА=ОХС-ЛПНП/ЛПВП [1]. Прогноз с ИА выше 3 считали неблагоприятным.

ДНК испытуемых была выделена из периферической крови человека стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции [12] с их добровольного письменного согласия. Для полимеразной цепной реакции синтеза ДНК (ПЦР) использовали праймеры, синтезированные фирмой «Евроген» (Москва). Данные по праймерам для детекции Alu-элементов в генах *ACE*, *ABCA6*, *ABCA10* были взяты из базы данных инсерционного полиморфизма ретротранспозонов dbRIP [18]. Последовательности праймеров представлены в таблице.

Таблица. Последовательности праймеров для ПЦР

| Alu-элемент | Праймеры | Аmplif. фрагменты |
|------------------|---|----------------------|
| <i>Ya5NBC102</i> | Pr For: TCCCATTCTCTAGACCTGCTG Pr Rev: CCCATAACAGGTCTTCATATTTCC | I:483 bp D:194 bp |
| <i>Ya5_435</i> | Pr For:CTGGCGACTAAGGTGAAAGC PrRev:AAAAGGTAATCCCTCTATCCTTGG | I:407 bp D:96 bp |
| <i>Yb8NBC48</i> | Pr For: AGGGAACAGGTGATGTTTGG Pr Rev: GAGGATGCAAAAGCATGTGA | I:511 bp D:178 bp |

Реакционная смесь на 1 образец включала в себя 0,9 мкл буфера для Taq-полимеразы (SybEnzyme, Новосибирск), смесь динуклеотидтрифосфатов (SybEnzyme, Новосибирск) объемом 0,7 мкл, по 2 мкл разведенных праймеров, деионизированную воду 3,2 мкл, Taq-полимеразу (SybEnzyme, Новосибирск) 0,2 мкл и образец ДНК-1 мкл. Продукты амплификации анализировались путем проведения электрофореза в 1,5% агарозном геле. Буфером для электрофоретической реакции являлся 1^x TBE.

Визуализацию ДНК проводили в ультрафиолетовом свете трансиллюминатора.

Статистическая обработка данных, полученных в ходе генотипирования Alu-инсерции в гене *ABCA6* и оценки индивидуальных параметров липидного профиля испытуемых, проводилась с использованием программ STATISTICA v.6.0, MS Excel 2003, GENEPOP v.1.2 и RxC.

При попарном сравнении частот аллелей и генотипов между группами с разными значениями липидного профиля использовали критерий χ^2 с поправкой Йетса для небольших выборок. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Поскольку АТФ-связывающий кассетный переносчик *ABCA6* задействован в транспортировке различных субстратов через биологические мембраны [8,14] и исходя из его близкого родства с *ABCA1*, играющего важную роль в оттоке холестерина и фосфолипидов из макрофагов [10], мы предположили, что Alu-инсерция *Ya5_435* в гене *ABCA6* оказывает определенное влияние на метаболизм липидов. Для подтверждения этой гипотезы изучили влияние Alu-инсерции *Ya5_435* на показатели липидного профиля. При рассмотрении влияния Alu-инсерции в гене *ABCA6* на уровень ОХС и ЛПНП статистически значимых различий выявлено не было. В группе с высокими показателями ТГ частота генотипа *ABCA6*D/*D* была достоверно выше, чем в группе, где этот показатель находился в норме ($55.27 \pm 8.06\%$ против $33.45 \pm 2.82\%$; $\chi^2=5.98$; $p=0.015$; OR=2.45; 95%CL=1.17-5.15). Соответственно, наблюдали достоверное увеличение частоты носительства аллеля *ABCA6*D* в группе с высоким уровнем ТГ и уменьшение частоты аллеля *ABCA6*I* (76.32 ± 4.87 против 60.07 ± 2.07 ; $\chi^2=6.81$; $p=0.009$;

OR=2.14; 95%CL=1.19-3.88). Таким образом, инсерция Alu-элемента в ген *ABCA6* может приводить к снижению, а ее отсутствие – к повышению уровня триглицеридов в плазме крови, одного из основных источников энергии для организма человека.

При сравнении групп с низким и нормальным уровнем ЛПВП наблюдали достоверное увеличение частоты генотипа *ABCA6* I/* I* в группе с низким уровнем ЛПВП (25±7.22% против 10.65±2.09%; $\chi^2=4.51$; $\rho=0.034$; OR=2.79; 95%CL=1.07-7.19). Соответственно, в изучаемых группах наблюдалось статистически значимое различие в частоте аллелей. В группе с низким уровнем ЛПВП носители аллеля *ABCA6* I* наблюдались достоверно чаще (51.38±5.89% против 35.88±2.31%; $\chi^2=5.654$; $\rho=0.018$; OR=1.89; 95%CL=1.11-3.21). Провели также сравнение групп с низким и высоким уровнем ЛПВП, в целом подтвердившее данные о том, что носительство генотипа *ABCA6* I/* I* чаще встречается в группе с низким уровнем ЛПВП. Полученные значения были близки статистически значимым (25±7.22% в группе с низким уровнем ЛПВП против 9.375±3.64 в группе с высоким уровнем; $\chi^2=3.27$; $\rho=0.07$; OR=3.22; 95%CL=0.92-11.54). Анализ распределения частот аллелей подтвердил, что частота аллеля *ABCA6* I* в группе с низким уровнем ЛПВП выше, чем в группе с высоким уровнем ЛПВП (51.38±5.89% против 37.5±4.28%; $\chi^2=3.09$; $\rho=0.078$; OR=1.76; 95%CL=0.94-3.30). Поскольку низкий уровень ЛПВП является одним из неблагоприятных атерогенных факторов, а также заболеваний сердца и сосудов, для всех изученных индивидуумов был рассчитан ИА, в соответствии со значениями которого они были разделены на 2 группы: группа с благоприятным прогнозом и группа повышенного риска. Носительство генотипа *ABCA6* I/* I* чаще наблюдалось в группе повышенного риска, чем в группе с благоприятным прогнозом (20.83±4.78% против 9.31±1.85%; $\chi^2=5.99$; $\rho=0.015$; OR=2.56; 95%CL=1.18-5.52). Также было показано, что носители аллеля *ABCA6* I* встречаются достоверно чаще, а аллель *ABCA6* D* достоверно реже в группе людей с высокими значениями индекса атерогенности, чем в группе людей с индексом атерогенности ниже 3 (46.53±4.16% против 35.02±2.15%; $\chi^2=5.811$; $\rho=0.016$; OR=1.615; 95%CL=1.089-2.393). Таким образом, инсерция Alu-элемента *Ya5_435* в ген АТФ-связывающего кассетного переносчика *ABCA6* может вести к повышению риска развития атеросклеротических отложений на стенках сосудов и заболеваний сердечно-сосудистой системы.

Исходя из высокого уровня гомологии белка ABCA10 с белком ABCA6, мы надеялись, что он обладает сходными с ним функциями. Однако анализ ассоциаций инсерции Alu-элемента *Yb8NBC48* в гене *ABCA10* не выявил статистически значимого влияния на параметры липидного профиля. При проведении генотипирования также не было выяв-

лено генотипа *ABCA10* I/* I*. Однако частота генотипа *ABCA10* I/* D* в группе с людьми с благоприятным прогнозом по развитию атеросклероза была достоверно больше таковой, чем в группе, где прогноз был неблагоприятен (65.58±3.02% против 49.27±6.01%; $\chi^2=5.42$; $\rho=0.02$; OR=1.96; 95%CL=1.10-3.48). Частота генотипа *ABCA10* D/* D* была достоверно ниже в группе с низкими значениями ИА, чем в группе с высокими (34.42±3.02% против 50.73±6.01%; $\chi^2=5.42$; $\rho=0.02$; OR=0.51; 95%CL=0.29-0.91). Различия в частотах аллелей были близки статистически значимым. При этом частота аллеля *ABCA10* D* была несколько ниже в группе с низким уровнем ИА (67.21±2.1% против 75.36±3.67%; $\chi^2=2.98$; $\rho=0.08$; OR=0.67; 95%CL=0.43-1.05). Возможно, полученные значения обусловлены лишь косвенным влиянием инсерции Alu-элемента в гене *ABCA10* на метаболизм липидов, а точнее тем, что они являются неспецифическими субстратами для ABCA10.

При изучении влияния инсерции *Ya5NBC102* в гене ангиотензин-превращающего фермента ACE на ОХС, ТГ, ЛПНП и ИА не было выявлено статистически достоверных значений. Однако сравнение групп с нормальными и низкими значениями уровня ЛПВП таковые выявило. Частота генотипа *ACE* I/* I* в группе с нормальными значениями уровня ЛПВП была достоверно ниже, чем в группе с низким уровнем ЛПВП (20.83±2.76% против 41.67±8.21%; $\chi^2=2.98$; $\rho=0.013$; OR=6.28; 95%CL=0.17-0.82). При этом частота генотипа *ACE* I/* D* была достоверно выше в группе с нормальным уровнем ЛПВП (59.26±3.34% против 38.89±8.22%; $\chi^2=4.41$; $\rho=0.036$; OR=2.29; 95%CL=1.05-5.01). Однако сравнение частот аллелей *ACE* I* и *ACE* D* в этих группах не выявило достоверных различий. Для подтверждения влияния гена ACE на уровень ЛПВП провели сравнение частот генотипов и аллелей в группах с низким и высоким уровнем ЛПВП. При этом была выявлена тенденция к увеличению частоты генотипа *ACE* I/* I* в группе с низкими значениями уровня ЛПВП, по сравнению с группой с высокими показателями (41.67±8.21% против 21.875±5.17%; $\chi^2=3.47$; $\rho=0.06$; OR=2.55; 95%CL=0.96-6.83). Таким образом, инсерция Alu-элемента в ген ACE может оказывать некоторое влияние на уровень ЛПВП, что является одним из факторов риска при заболеваниях сердца и сосудов.

Заболевания сердца и сосудов на сегодняшний день входят в число самых распространенных и опасных для здоровья человека болезней. Значительное влияние на риск их развития оказывает образ жизни человека и условия окружающей среды. Однако гораздо больший вклад в этот процесс вносит наследственная предрасположенность к нарушениям в метаболизме липидов. Нами показано, что инсерция Alu-элемента *Ya5_435* в ген АТФ-связывающего кассетного транспортера *ABCA6* может приводить к изменению уровня триглицери-

дов и уменьшению уровня липопротеидов высокой плотности. Недостаточное количество последнего является одним из факторов, способствующих развитию атеросклеротических отложений на стенках сосудов и повышению риска развития сердечно-сосудистых заболеваний. Гомозиготное носительство инсерции Alu-элемента (генотип *ABCA6*1/*1*) в гене кассетного переносчика *ABCA6* ассоциировано со снижением уровня ЛПВП и может оказывать влияние на риск развития атеросклероза. Возможно, при генотипе *ABCA6*1/*D* значительное компенсаторное действие оказывает аллель *ABCA6*D*, то при гомозиготном носительстве Alu-инсерции в этом кассетном переносчике такое влияние отсутствует, и он работает некорректно. Также показано, что инсерция Alu-элемента в гене *ABCA10* чаще встречается в группе с низкими значениями ИА, и, следовательно, может обладать некоторым антиатерогенным эффектом. Гомозиготный по инсерции генотип *ACE*1/*1* ассоциирован с уменьшением уровня ЛПВП, что может влиять на возможность развития болезней сосудов и сердца.

Полученные в ходе данной работы результаты можно объяснить тем, что организм человека является сложной системой взаимодействующих между собой генов. Инсерция Alu-элемента в какой-либо ген способна оказать влияние на всю систему в целом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Климов А.Н., Никульчева Н.Г. Липиды, липопротеиды и атеросклероз. СПб.: Питер Пресс, 1995. 304 с.
2. Хитринская И.Ю., Степанов В.А., Пузырев В.П. Alu-повторы в геноме человека // Молекулярная биология. 2003. Т. 37. № 3. С. 382-391.
3. Batzer M.A., Arcot S.S., Phinney J.W. et al. Genetic variation of recent Alu insertions in human populations // J. Mol. Evol. 1996. V. 46. P. 22-29.
4. Comas D., Calafell F., Benchemsi N. et al. Alu insertion polymorphisms in NW Africa and the boundary through the Gibraltar straits // Hum. Genet. 2000. V. 107. № 4. P. 312-319.
5. Deininger P.L., Batzer M.A. Alu repeats and human disease // Genetics and Metabolism. 1999. V. 67. P. 183-193.
6. Friedwald W.T., Levy R.Z., Fredrickson D.S. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge // Clinical Chem. 1972. V. 18. №6. P. 499-502.
7. Glavinas H., Krajcsi P., Cserepes J., Sarkadi B. The Role of ABC Transporters in Drug Resistance, Metabolism and Toxicity // Current Drug Delivery. 2004. № 1. P. 27-42.
8. Kaminski W.E., Wenzel J.J., Piehler A. et al. ABCA6, a novel a subclass ABC transporter // Biochem. Biophysiol. Res. Comm. 2001. № 285 (5). P. 1295-1301.
9. Kubo Y., Sekiya S., Ohigashi M. et al. ABCA5 Resides in Lysosomes, and ABCA5 Knockout Mice Develop Lysosomal Disease-Like Symptoms // Mol. Cell. Biol. 2005. V. 25. №. 10. P. 4138-4149.
10. Leprohon P., Le'gare D., Girard I. et al. Modulation of Leishmania ABC Protein Gene Expression through Life Stages and among Drug-Resistant Parasites // Eucariotic Cell. 2006. V. 5. № 10. P. 1713-1725.
11. Lott P.-L., Mundry M., Sassenberg C. et al. Simplifying gene trees for easier comprehension // BMC Bioinformatics. 2006. № 7. P. 1-15.
12. Mathew C.C. The isolation of high molecular weight eukaryotic DNA // Methodes in Molecular Biology. V. 2 / Ed. Walker I. M. Y.I. Human press, 1984. P. 31-34.
13. Pennings M., Meurs I., Ye D., Out R. et al. Regulation of cholesterol homeostasis in macrophages and consequences for atherosclerotic lesion development // FEBS Lett. 2006. V. 580. Is. 23. P. 5588-5596.
14. Pohl A., Devaux P.F., Herrmann A. Function of prokaryotic and eukaryotic ABC proteins in lipid transport // Biochim. et Biophys. Acta – Mol. and Cell Biol. of lipids. 2005. V. 1733. Is. 1. P. 29-52.
15. Rigat B., Hubert C., Alhenc-Gelas F. et al. An insertion/deletion polymorphism in angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels // J. Clin. Invest. 1990. V. 86. № 4. P. 1343-1346.
16. Stoneking M., Fontius J., Clifford S. et al. Alu insertion polymorphisms and human evolution: evidence for a larger population size in Africa // Genome Res. 1997. № 7 (11). P. 1061-1071.
17. Vasilio V., Vasilio K., Nebert D.W. Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family // Hum. Genom. 2009. № 3 (3). P. 281-290.
18. Wang J., Song L., Grover D. et al. A highly integrated database of retrotransposon insertion polymorphisms in humans // Hum. Mutat. 2006. № 27 (4). P. 323-329.
19. Wenzel J., Kaminski W., Piehler A. et al. ABCA10, a novel cholesterol-regulated ABCA6-like ABC transporter. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2003. № 306 (4). P. 1089-1098.
20. Wenzel J.J., Piehler A., Kaminski W.E. ABC A-subclass proteins: Gatekeepers of cellular phospho- and sphingolipid transport // Frontiers in Bioscience. 2007. № 12. P. 3177-3193.

INFLUENCE OF Alu-INSERTIONS FOR LIPID METABOLISM

© 2011 I.V. Nikolaev, L.R. Kayumova, G.R. Gumerova, E.V. Vorob'eva, V.Yu. Gorbunova

Bashkir State Pedagogical University named by M. Akmulla, Ufa

In this article we examine the effect of three Alu-insertion (in the genes *ACE*, *ABCA6* and *ABCA10*) on lipid metabolism in humans. A search for associations of allele and genotype frequencies of genes containing insertion of Alu-elements, with such parameters for lipid profile: total cholesterol (TC), triglycerides (TG), low-density lipoprotein (LDL) I, high density lipoprotein (HDL) and atherogenic index (AI).

Key words: insertion, lipid metabolism, Alu-element, atherogenic index.

Nikolaev Ivan Vladislavovich, e-mail: nikolaev.i.86@gmail.com; Kayumova Lilia Railevna, e-mail: kayumovalr@mail.ru; Gumerova Guzel Rifovna, e-mail: gumerovagr@yandex.ru; Vorob'eva Elena Vladimirovna, Candidate of Biology, e-mail: vorobyevaev@rambler.ru; Gorbunova Valentina Yurevna, Doctor of Biology, Professor, e-mail: obg_bspu@mail.ru