

Количество активных рибосомных генов в геномах носителей аллельных вариантов генов глутатион-S-трансфераз *GSTT1* и *GSTM1**

Ляпунова Н.А.¹, Ревазова Ю.А.²

¹ — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Медико-генетический научный центр»; e-mail: nlyapunova@yandex.ru

² — Федеральное бюджетное учреждение науки «Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора

В геномах 44 практически здоровых индивидов (13 мужчин и 31 женщина в возрасте от 17 до 65 лет), у которых ранее были охарактеризованы полиморфные варианты генов ферментов 2-й стадии биотрансформации (детоксикации) ксенобиотиков (ГФБК) *GSTM1* и *GSTT1*, определена геномная доза активных рибосомных генов (АкРГ) и проведен анализ сочетания в индивидуальных геномах вариантов ГФБК и количества копий АкРГ. Показано, что геномы носителей непротективных (функционально неактивных) аллелей генов *GSTT1* и *GSTM1* содержат достоверно более высокие геномные дозы АкРГ, чем геномы носителей функционально активных («благоприятных») аллелей этих генов. Полученные результаты позволяют заключить, что геномная доза АкРГ оказывает определенное влияние на вероятность выживания (жизнеспособность) носителей разных вариантов изученных нами генов ГФБК.

Ключевые слова: генетическая индивидуальность человека; геномная доза рибосомных генов (генов рРНК); протективные/непротективные аллели генов *GSTT1* и *GSTM1*

Введение

Генетическая индивидуальность человека является одним из важнейших факторов, определяющих реакцию человека на различные воздействия внешней среды [1]. Известен ряд ферментов, участвующих в метаболизме ксенобиотиков и обеспечивающих защиту организма человека от повреждающих воздействий токсических и мутагенных соединений. Выявлены и интенсивно изучаются различные по экспрессии варианты этих ферментов, кодируемые разными аллелями одного и того же гена [1, 5]. Накопление информации о функциях полиморфных вариантов ГФБК свидетельствует о значительном вкладе этих генов в формирование генетического разнообразия человека [5, 10, 11].

Наряду с этим существенный вклад в генетическую индивидуальность человека вносят гены, кодирующие 18S-, 28S- и 5.8S- рибосомные РНК. Рибосомные гены (РГ) собраны в транскрибируемой области (ТО) рибосомного повтора (РП, рДНК), который представлен в геномах эукариот многими копиями. Согласно нашим данным [3] количество (геномная доза) РП в индивидуальных геномах человека варьирует в широких пределах: от 250 до 670 копий на диплоидный геном, при среднем значении около 400—420 копий. В функциональном отношении копии РП не одинаковы и в соматических клетках представлены фракциями *активных* (транскрибирующихся в соматических клетках); *потенциально активных* (способных к транскрипции, но «не работающих» в данное время в данном типе клеток); *неактивных*, слабо метилированных, и «*молчащих*», интенсивно

метилированных копий РГ [4, 6, 14]. В интерфазе пролифелирующих клеток транскрибируются все копии фракций активных и потенциально активных РГ. Количество этих копий характеризует совокупность РГ, обозначенную в дальнейшем как активные рибосомные гены (АкРГ).

В геноме человека кластеры РГ разного размера локализованы в коротких плечах пяти пар акроцентрических хромосом (хромосомы 13—15, 21 и 22), где они формируют ядрышкообразующие районы (ЯОР). В 70-е годы прошлого столетия были разработаны методы, позволяющие избирательно окрашивать азотнокислым серебром кластеры АкРГ в составе ЯОР метафазных хромосом [12, 13]. На этой основе нами был предложен метод определения количества копий АкРГ в индивидуальных геномах человека [7, 8]. Количество АкРГ в геномах разных индивидов варьирует в пределах от 120 до 190 копий [7, 9] и составляет от 20 до 40% общего числа копий РГ [2].

Гены рРНК обеспечивают клетку рибосомами, от количества которых зависит скорость синтеза белков, необходимых для жизнедеятельности клетки, защиты и сохранения гомеостаза организма. Однако при оценке генетической индивидуальности человека, до последнего времени геномной дозе РГ и, тем более, количеству копий АкРГ в индивидуальных геномах человека внимание практически не уделялось.

Данное исследование было предпринято с целью изучения влияния геномной дозы АкРГ на жизнеспособность носителей аллельных вариантов генов двух ферментов 2-й стадии биотрансформации (детоксика-

* Работа выполнена при частичной поддержке грантом РФФИ, проект 08-04-00876.

ции) ксенобиотиков, глутатион-S-трансфераз *GSTM1* и *GSTT1* и их сочетаний. Наряду с условно нормальными (протективными) вариантами, эти ферменты представлены вариантами с делециями, вызывающими полную потерю функциональной активности фермента. В результате в организме носителя такого варианта оказывается сниженной способность детоксикации ксенобиотиков, а присутствие делетированного аллеля в гомозиготном состоянии приводит к развитию различных заболеваний, в том числе онкологических [5, 11].

Материал и методы

Для исследования были отобраны 44 некурящих жителя Москвы (13 мужчин и 31 женщина) в возрасте от 17 до 65 лет. Ранее в ДНК этих индивидов методом мультиплексной ПЦР с последующим анализом продуктов амплификации на электрофореграммах, были определены нормальные и делеционные аллели генов *GSTM1* и *GSTT1* [5]. В дальнейшем эти варианты обозначены как М+ и Т+, если в геноме присутствовали оба или один нормальный («благоприятный», протективный) аллель гена, и как М0 и Т0, если в двух аллелях гена имела протяженная делеция («неблагоприятные» варианты фермента).

В краткосрочных культурах лимфоцитов периферической крови 44 отобранных лиц мы определили количество генов фракции АкРГ на препаратах метафазных хромосом, после селективной окраски их нитратом серебра по методу Хоуэл и Блека [13], в нашей модификации [7, 8]. При использованной окраске преципитат металлического серебра выявляется только в кластерах РГ, активных в отношении транскрипции, то есть в тех генах рРНК, которые транскрибировались в предшествующей митозу интерфазе [15]. Размер преципитата серебра (АгЯОР) пропорционален количеству активных копий РГ в данном ЯОР и может быть оценен в условных единицах (баллах) от 0 до 3 (редко до 4). Размер

АгЯОР постоянен для каждого из 10 ЯОР генома данного индивида, сохраняется в ряду клеточных делений и передается по наследству в поколениях как менделевский признак [15–17]. Геномную дозу АкРГ мы определяем как средний суммарный размер 10 АгЯОР, оцененный не менее, чем в 20 клетках и выраженный в условных единицах. В специальном исследовании было показано, что одной условной единице количества АкРГ в геноме человека соответствует 8 ± 1 копия рибосомных генов [2]. Это позволяет выражать количество АкРГ в диплоидном геноме числом копий гена. Детальное описание метода и оценку его надежности можно найти в публикациях [7, 8, 9].

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием компьютерной программы Statistica v. 6.0. Данные в таблице и тексте приведены в виде среднего значения и среднеквадратичной ошибки (SE). Для определения достоверности межгрупповых различий использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA).

Результаты и обсуждение

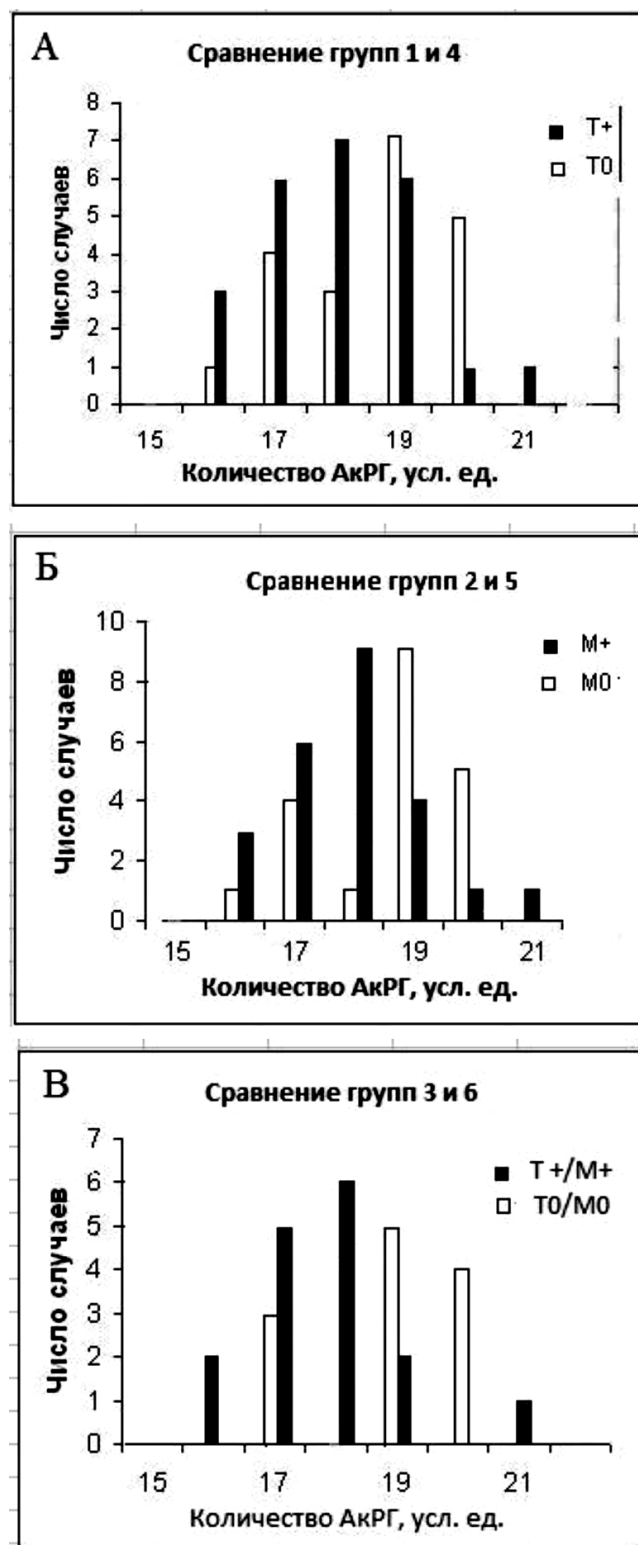
Геномная доза АкРГ во всей выборке 44 культур клеток варьировала в пределах от 16,1 до 22,1 усл. ед., (128 и 178 копий АкРГ) при среднем значении $18,8 \pm 0,14$ усл. ед. (150 ± 1 копия), что хорошо соответствует характеристикам копийности АкРГ в большой выборке ($n = 1100$) исследованных нами геномов здоровых индивидов разного пола и возраста [9]. В этой выборке количество АкРГ в диплоидных геномах варьировало в пределах от 120 до 190 копий при среднем значении 150 копий и подчинялось закону нормального распределения.

Для анализа сочетанного влияния вариантов ГФБК и геномной дозы АкРГ на жизнеспособность организма, нами были сформированы 8 групп индивидов с разными комбинациями вариантов генов *GSTT1*, *GSTM1* и их со-

Таблица

Геномная доза активных рибосомных генов (АкРГ) в группах культур клеток с разными вариантами генов гуанидин-S-трансфераз *GSTT1* и *GSTM1* и их сочетаний

Группа	Вариант	Число случаев	АкРГ, усл. ед. Среднее $\pm$ S.E.
1	Т+	24	$18,44 \pm 0,25$
2	М+	24	$18,41 \pm 0,24$
3	Т+/М+	16	$18,29 \pm 0,30$ *
4	Т0	20	$19,10 \pm 0,28$
5	М0	20	$19,11 \pm 0,29$
6	Т0/М0	12	$19,36 \pm 0,35$ *
7	Т0/М+	8	$18,65 \pm 0,45$
8	Т+/М0	8	$18,72 \pm 0,49$
Примечание. * Жирным шрифтом выделены минимальное и максимальное значения			



Сравнение распределения носителей протективных (+) и непротективных (0) вариантов глутатион-S-трансфераз *GSTT1* (А), *GSTM1* (Б) и их сочетаний (В) в зависимости от количества копий АкРГ в геномах носителей. Номера сравниваемых групп указаны в соответствии с таблицей.

четаний (таблица). В сформированных группах обнаружены закономерные различия по содержанию АкРГ в геномах. В группах 1, 2. и 3, содержащих протективные варианты генов *GSTT1* и *GSTM1* (Т+, М+ и Т+/М+), содержание АкРГ оказалось достоверно меньше, чем в группах 4, 5 и 6, ($p < 0,05$), где собраны культуры клеток, в которых либо в одном из генов (группы 4 и 5), либо в обоих генах (группа 6) оба аллеля имели делетированные, функционально неактивные варианты генов (Т0, М0 и Т0/М0). В двух группах (7 и 8), геномы которых содержали комбинации «+» и «0» вариантов генов *GSTT1* и *GSTM1*, дозы АкРГ имели промежуточные значения. Полученные результаты позволяют предположить, что для выживания носителей непротективных вариантов изученных нами ГФБК требуются более высокие геномные дозы АкРГ в сравнении с носителями протективных вариантов.

На рисунке (А, Б, В) показано попарное сравнение числа индивидов с протективными и непротективными вариантами генов *GSTT1* (А), *GSTM1* (Б) и их сочетанных вариантов (В), в группах с разным количеством АкРГ в геномах. При этом можно отметить, что распределение носителей протективных вариантов близко к среднепопуляционному, в то время, как распределение носителей непротективных аллелей во всех трех выборках концентрируется в области более высоких доз АкРГ.

Поскольку оба признака, геномная доза АкРГ и варианты (аллели) ГФБК являются постоянными признаками генома каждого индивида, полученные нами результаты позволяют заключить, что геномная доза АкРГ оказывает выраженное влияние на вероятность выживания зигот (организмов) с разными вариантами изученных нами генов ферментов 2-й стадии биотрансформации ксенобиотиков (*GSTT1* и *GSTM1*). Для выживания носителям непротективных вариантов (функционально неактивных аллелей *GSTT1* и *GSTM1*) требуются более высокие геномные дозы АкРГ, чем носителям функционально активных («благоприятных») аллелей генов детоксикации. Селекция (гибель/выживание) геномов может происходить на разных стадиях онтогенеза и проявляться как в эмбриональном развитии (гибель зиготы, эмбриона или плода), так и в постнатальном периоде (ранняя смертность).

В целом, проведенное исследование и представленные в работе результаты — это первая попытка такого анализа. Аналоги нашей работы в мировой литературе нам не известны.

Список литературы

1. Баранов В.С., Баранова Е. В., Иващенко Т.Э., Асеев М.В. Геном человека и гены «предрасположенности». — СПб. — Интермедика, 2000 — 272 с.
2. Вейко Н.Н., Структурно-функциональная организация рибосомных повторов человека. // Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук. — Москва. 2001. 258 С.

3. Вейко Н.Н., Еголина Н.А., Радзивил Г.Г., Нурбаев С.Д., Косякова Н.В., Шубаева Н.О., Ляпунова Н.А. Количественное определение повторяющихся последовательностей в геномной ДНК человека. Обнаружение увеличенного количества рибосомных повторов в геномах больных шизофренией (результаты молекулярного и цитогенетического анализа). // Молекул. биология. — 2003. — Т. 37. — №3. — С. 409-419.
4. Вейко Н.Н., Ляпунова Н.А. Характеристика четырех фракций рибосомного повтора генома человека, и их организация в ядрах лимфоцитов. // Цитология. — 2005. — Т. 47. — № 9. — С. 800-801
5. Григорьева С.А., Никитина В.А., Косякова Н.В., Кириллов А.В., Аксенова М.Г., Сидорова И.Е., Ревазова Ю.А., Чеботарев А.Н., Бочков Н.П. Частота полиморфизмов генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков *CYP1A1*, *GSTM1* и *GSTT1* у жителей г. Москвы // Медицинская генетика — 2007. — №3. — С.38-43.
6. Ляпунова Н.А., Вейко Н.Н. Рибосомные гены в геноме человека: идентификация четырех фракций, их организация в ядрышке и метафазных хромосомах. // Генетика.- 2010. — Т. 46. — №9. — С. 1205-1209.
7. Ляпунова Н.А., Еголина Н.А., Цветкова Т.Г., Вейко Н.Н., Кравец-Мандрон И.А., Громова Э.В., Мхитарова Е.В., Косякова Н.В., Виктор В.В. Ядрышкообразующие районы (ЯОР) хромосом человека: опыт количественного цитологического и молекулярного анализа. // Биологические мембраны. — 2001. — Т. 18. — № 3. — С. 189-199.
8. Ляпунова Н.А., Кравец-Мандрон И.А., Цветкова Т.Г. Цитогенетика ядрышкообразующих районов (ЯОР) хромосом человека: выделение четырех морфофункциональных вариантов ЯОР их межиндивидуальное и межхромосомное распределение.// Генетика. — 1998. — Т. 34. — №9. — С. 1298-1306.
9. Пороховник Л.Н., Моделирование организации активных рибосомных генов в геноме человека и фенотипических проявлений их копийности. // Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. — Москва. 2013, 139 С.
10. Ревазова Ю.А., Хрипач Л.В., Сидорова И.Е., Юрченко В.В., Зыкова И.Е. Комплексный подход в оценке нестабильности генома человека. // Вестник РАМН. — 2006. — №4. — С. 36-41.
11. Ревазова Ю.А., Чеботарев А.Н., Хрипач Л.В., Григорьева С.А., Кириллов А.В., Никитина В.А., Косякова Н.В., Катосова Л.Д., Платонова В.И., Подольная М.А., Журков В.С., Бочков Н.П. Генетический полиморфизм и частота спонтанных и индуцированных хромосомных aberrаций в лимфоцитах жителей Москвы. // Медицинская генетика. — 2009. — №4. — С. 26-35.
12. Goodpasture C., Bloom S.E. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. // Chromosoma. — 1975. — V. 53. — P. 37-50.
13. Howell W.M., Black D.A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method // Experientia. — 1980. — V. 36. — P. 1014-1015
14. Lyapunova N.A., Veiko N.N., Porokhovnik L.N. Human rDNA Genes: Identification of Four Fractions, Their Functions and Nucleolar Location // Chap. 5, P. 95-119. In Proteins of the Nucleolus: Regulation, Translocation and Biomedical Functions. Eds D.H.O'Day and A.Catalano. 2013. Springer Publishing Company, UK. 371 pp.
15. Miller D.A., Dev V.G., Tantravahi R., Miller O.J. Suppression of human nucleolus organizer activity in mouse-human somatic hybrid cells. // Experimental Cell Research. — 1976. — V. 101. — P. 235-243.
16. Taylor E.F., Martin-DeLeon P.A. Familial silver staining patterns of human nucleolus organizer regions (NORs). // Am J Hum Genet. — 1981. — V. — 33. — P. — 67-76
17. Velazquez M., Visedo G., Ludena P., de Cabo S.F., Sentis C., Fernandez-Piqueras J. Cytogenetic analysis of a human familial 15p+ marker chromosome. // Genome. — 1991. — V. 34. — №5. — P. 827-829.

Copy numbers of active ribosomal genes in genomes carrying different allelic variants of genes for glutathione S-transferases *GSTT1* and *GSTM1*

Lyapunova N.A.¹, Revazova Yu.A.²

¹ — Federal state budgetary institution «Research Centre for Medical Genetics»; e-mail: nlyapunova@yandex.ru

² — Federal budgetary Establishment of science «Federal Scientific Center of Hygiene named after F.F. Erisman» of the Rospotrebnadzor

Genomic dosages of active ribosomal genes (AcRG) were determined in genomes of 44 apparently healthy subjects (13 men and 31 women aged 17 to 65 years). Previously, polymorphisms of the genes for phase II xenobiotic detoxification enzymes (GXDE) *GSTM1* and *GSTT1* were identified in the same subjects. After that, an analysis of combinations of GXDE variants and AcRG copy numbers was performed for each individual genome. The analysis has shown that genomes carrying non-protective (functionally inactive) alleles of *GSTM1* and *GSTT1* contain significantly higher genomic dosages of AcRG than genomes carrying functionally active ('favourable') alleles of these genes. The findings suggest that the genomic dosage of AcRG exerts certain influence on survival probability (viability) of carriers of the GXDE variants we studied.

Keywords: human genetic individuality; active ribosomal genes; genomic dosages; protective/non-protective alleles of *GSTM1* and *GSTT1* genes