

Ген гамма-глутамилциклотрансферазы – ключевого фермента катаболизма глутатиона и предрасположенность к ишемическому инсульту: анализ ассоциаций с болезнью и функциональное аннотирование ДНК-полиморфизмов

Бочарова Ю.А.¹, Азарова Ю.Э.², Клёсова Е.Ю.², Дроздова Е.Л.², Солодилова М.А.², Полоников А.В.²

1 — ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»
308015, г. Белгород, ул. Победы, 85

2 — ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации
305041, г. Курск, ул. Карла Маркса, д. 3

Генетико-эпидемиологическими исследованиями установлено, что полиморфные варианты генов ферментов антиоксидантной системы являются значимыми предикторами риска развития и тяжести проявления ишемического инсульта (ИИ). Целью настоящего исследования было изучение ассоциации трех частых однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) rs38420, rs4270 и rs6462210 гена гамма-глутамилциклотрансферазы (GGCT) – ключевого фермента катаболизма глутатиона с риском развития ИИ и функциональное аннотирование этих SNPs. Материалом для исследования послужили образцы ДНК 1288 неродственных индивидов славянского происхождения, в том числе 600 пациентов с диагнозом ИИ и 688 относительно здоровых добровольцев. Генотипирование полиморфных вариантов гена GGCT осуществлялось с использованием технологии iPLEX на генетическом анализаторе MassARRAY-4. Функциональное аннотирование SNPs осуществлялось биоинформатическими методами с использованием различных онлайн-инструментов и баз данных. Установлена ассоциация генотипа TT SNP rs6462210 с пониженным риском развития ишемического инсульта (OR=0,36 95%CI 0,15–0,85, p=0,01). Биоинформатический анализ регуляторного потенциала исследованных полиморфных вариантов показал, что их фенотипические эффекты проявляются ослаблением транскрипционной активности гена GGCT преимущественно в клетках крови и артериях, главным образом, в результате химических модификаций хроматина. У полиморфизма rs4270, находящегося в тесном неравновесии по сцеплению с SNP rs6462210 ($D' = 0,966$, $p < 0,01$), обнаружен участок связывания с микроРНК hsa-miR-1246, способной блокировать экспрессию GGCT, тем самым, способствуя снижению образования L-цистеина – предшественника глутатиона. В результате исследования впервые показано, что вариабельность гена GGCT может вносить вклад в развитие ИИ. Экспериментальные исследования по оценке регуляторного потенциала полиморфных вариантов гена GGCT потребуются для патофизиологической интерпретации выявленных ассоциаций.

Ключевые слова: ишемический инсульт, метаболизм глутатиона, гамма-глутамилциклотрансфераза (GGCT), однонуклеотидный полиморфизм (SNP), экспрессия гена, модификация гистонов, аннотирование SNPs.

Для цитирования: Бочарова Ю.А., Азарова Ю.Э., Клёсова Е.Ю., Дроздова Е.Л., Солодилова М.А., Полоников А.В. Ген гамма-глутамилциклотрансферазы – ключевого фермента катаболизма глутатиона и предрасположенность к ишемическому инсульту: анализ ассоциаций с болезнью и функциональное аннотирование ДНК-полиморфизмов. *Медицинская генетика* 2020; 19(10): 32-39.

DOI: 10.25557/2073-7998.2020.10.32-39

Автор для корреспонденции: Бочарова Юлия Александровна; e-mail: y_u_l_i_a_03@mail.ru

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (соглашение № 15-15-10010)

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 20.07.2020.

Gene of gamma-glutamylcyclotransferase, a key enzyme of glutathione catabolism, and predisposition to ischemic stroke: association analysis and functional annotation of gene polymorphisms

Bocharova J.A.¹, Azarova J.E.², Klyosova E.Yu.², Drozdova E.L.², Solodilova M.A.², Polonikov A.V.²

1 — Belgorod State National Research University
Pobedy str. 85, Belgorod, 308015, Russia

2 — Kursk State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation
K. Marks str. 3, Kursk, 305041, Russia

Genetic epidemiological studies have established that polymorphisms of the genes encoding antioxidant defense enzymes represent meaningful predictors for the risk and severity of ischemic stroke (IS). The aim of this study was to investigate associations of IS

with three common single nucleotide polymorphisms (SNPs) such as rs38420, rs4270 and rs6462210 in gamma-glutamylcyclotransferase (*GGCT*) gene, a key enzyme of glutathione catabolism. DNA samples obtained from 1288 unrelated individuals of Slavic origin, including 600 patients with IS and 688 healthy volunteers were included in the study. Genotyping of the *GGCT* polymorphisms was done using an iPLEX-based technology by the MassARRAY-4 system. Functional annotation of SNPs was performed using numerous online bioinformatics tools and resources. We found an association between genotype T/T rs6462210 and a decreased risk of ischemic stroke (OR = 0.36 95% CI 0.15–0.85, $p=0.01$). The haplotype rs38420A-rs4270T-rs6462210C showed a clear tendency in association with decreased disease risk ($p=0.057$). Bioinformatics analysis showed that the phenotypic effects of the SNPs are characterized by a weak transcriptional activity of the *GGCT* gene mainly in blood cells and arteries as a result of chemical modifications of chromatin. For the rs4270 polymorphism, which is in close linkage disequilibrium with SNP rs6462210 ($D'=0.966$, $p<0.01$), we found a binding site for miRNA hsa-miR-1246 which is capable to block the *GGCT* expression, thereby reducing the formation of L-cysteine, a precursor of glutathione. The study showed for the first time that *GGCT* gene may contribute to the development of ischemic stroke. Experimental studies focusing on the regulatory potential of *GGCT* gene polymorphisms are required for the pathophysiological interpretation of the identified associations.

Keywords: ischemic stroke, glutathione metabolism, gamma-glutamylcyclotransferase (*GGCT*), single nucleotide polymorphism (SNP), gene expression, histone modifications, SNP annotation.

For citation: Bocharova J.A., Azarova J.E., Klyosova E.Yu., Drozdova E.L., Solodilova M.A., Polonikov A.V. Gene of gamma-glutamylcyclotransferase, a key enzyme of glutathione catabolism, and predisposition to ischemic stroke: association analysis and functional annotation of gene polymorphisms. *Medical genetics*. 2020; 19(10): 32-39. (In Rus.).

DOI: 10.25557/2073-7998.2020.10.32-39

Corresponding author: Bocharova J.A.; e-mail: y_u_l_i_a_03@mail.ru

Funding. The study was supported by the Russian Science Foundation (agreement No. 15-15-10010).

Conflict of Interest. Authors declare no conflict of interest.

Accepted: 20.07.2020.

Введение

Цереброваскулярные заболевания занимают второе место среди ведущих причин смертности и инвалидизации населения экономически развитых стран мира [1]. Смертность от инсультов, в первую очередь от ишемических инсультов (ИИ), в Российской Федерации является одной из самых высоких в мире. Выявление новых молекулярных мишеней для терапии и расшифровка патогенетических механизмов развития ИИ будет способствовать разработке более эффективных средств лечения и профилактики болезней.

Многочисленными исследованиями показано, что этиология ИИ имеет мультифакториальную природу, а предрасположенность к болезни определяется сложным характером взаимодействия генетических и средовых факторов [2,3]. Одним из значимых молекулярных механизмов развития цереброваскулярной патологии являются нарушения в системе редокс-гомеостаза, характеризующиеся дисбалансом между генерацией и обезвреживанием активных форм кислорода, проводящих к формированию окислительного стресса, ответственного за развитие атеросклероза и повреждение головного мозга при ИИ [4–6]. Генетико-эпидемиологическими исследованиями установлено, что полиморфные варианты генов ферментов антиоксидантной системы являются значимыми предикторами риска развития и тяжести проявления ИИ. Однако исследования, выполненные до настоящего време-

ни в данном направлении, были ограничены генами глутатион S-трансфераз [7–9] или глутатионпероксидаз [10,11] – ферментов, функционирование которых определяется кофактором глутатионом.

Известно, что восстановленный глутатион (GSH) является основным медиатором антиоксидантной защиты мозга от его окислительного повреждения [12]. Активность ферментов, вовлеченных в биосинтез и катаболизм глутатиона, определяет его высокую внутриклеточную концентрацию, необходимую для обеспечения антиоксидантной защиты и поддержания окислительно-восстановительного баланса. Одним из таких ферментов является гамма-глутамилцикло-трансфераза (*GGCT*), которая катализирует предпоследнюю стадию катаболизма глутатиона, превращая гамма-глутамилдипептиды в 5-оксипролин. Ген *GGCT* экспрессируется в различных тканях, в том числе в артериальных сосудах и различных отделах головного мозга (данные порталов BioGPS <http://biogps.org> и GTEx <https://www.gtexportal.org>), что делает его привлекательным объектом для генетических исследований этиологии и патогенеза цереброваскулярных заболеваний. Однако исследований, направленных на оценку вовлеченности полиморфных вариантов гена *GGCT* в развитие цереброваскулярных заболеваний до настоящего времени не проводилось.

Целью настоящего исследования было изучение ассоциации трех частых однонуклеотидных полиморфиз-

мов (SNP) rs38420, rs4270 и rs6462210 гена *GGCT* с риском развития ИИ и функциональное аннотирование данных локусов.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили образцы ДНК из коллекции НИИ генетической и молекулярной эпидемиологии (НИИ ГМЭ) Курского государственного медицинского университета (КГМУ), полученные от 1288 неродственных индивидов славянского происхождения – уроженцев Центральной России (преимущественно русских жителей Курской области). Основную группу составляли 600 пациентов с диагнозом ИИ атеротромботического подтипа, верифицированным квалифицированными неврологами на основании клинических данных (отсутствие данных о кардиогенных и других причинах инсульта), результатов компьютерной и магнитно-резонансной томографии головного мозга, а также УЗ-сканирования общих сонных артерий. Контрольную группу составляли 688 относительно здоровых добровольцев без клинических проявлений сердечно-сосудистых и других хронических заболеваний. Сбор клинического и биологического материалов осуществлялся на базах неврологических отделений БМУ «Курская областная клиническая больница» и ОБУЗ «Курская городская клиническая больница скорой медицинской помощи» в течение 2-х периодов: с 2007 по 2014 гг. (клинический и биологический материалы биобанка НИИ ГМЭ) и с 2014 по 2017 гг. Протокол исследования был одобрен региональным этическим комитетом при Курском государственном медицинском университете (протокол № 4 от 14.04.2014).

Геномную ДНК выделяли стандартным двухэтапным методом фенольно-хлороформной экстракции с последующей преципитацией ДНК этанолом. Отбор ДНК-полиморфизмов гена *GGCT* для исследования основывался на оценке гаплотипической структуры гена (отбор tagSNPs, $r^2 \geq 0,8$), частоте минорного аллеля (MAF > 5%), регуляторном потенциале SNP – параметрах, необходимых для наиболее полного охвата вариабельности исследуемого гена [13]. Для отбора SNP-маркеров использовали биоинформатический инструмент GenePipe (<https://snpinfo.nih.gov/snpinfo/selegene.html>). В результате было отобрано четыре SNPs: rs4270, rs28679, rs38420 и rs6462210. При дизайне мультиплексной панели с использованием инструмента Assay Design Suite (Agena Bioscience, США) SNP rs28679 был исключен из мультиплекса по техническим параметрам. Мультиплексное генотипирование полиморфных вариантов гена *GGCT* осуществлялось с использованием технологии iPLEX на генетическом ана-

лизаторе MassARRAY-4 (Agena Bioscience, США) в лаборатории геномных исследований НИИ генетической и молекулярной эпидемиологии КГМУ. Праймеры были синтезированы компанией Евроген (г. Москва). Результаты повторного генотипирования для контроля качества 5% случайно отобранных образцов ДНК показали 100% конкордантность результатов.

Анализ ассоциаций аллелей, генотипов и гаплотипов *GGCT* с риском развития ИИ проводился методом множественно логистической регрессии с поправкой на пол и возраст с использованием статистического пакета SNPStats [14]. Поправка на множественность тестов осуществлялась процедурой FDR (<https://www.sdmproject.com/utilities/?show=FDR>). Функциональное аннотирование SNPs осуществлялось биоинформатическими методами с использованием различных онлайн-инструментов и баз данных. Для поиска *cis*-QTLs (локусов количественных признаков) в отношении исследованных полиморфизмов использовали базы данных: eQTLGen (<https://www.eqtlgen.org/cis-eqtls.html>), GTEx portal (<https://www.gtexportal.org>) и QTLbase (<http://mulinlab.tmu.edu.cn/qtlbase/index.html>). Для оценки взаимосвязи SNPs с эпигенетической регуляцией генной экспрессии (модификация гистонов, открытый хроматин, связывание CTCF, метилирование ДНК) и связывающей способностью с микроРНК использовались онлайн-ресурсы функционального аннотирования однонуклеотидных полиморфизмов SNPnexus (<https://www.snp-nexus.org/index.html>), интегрированного с экспериментальными данными проектов ENCODE (<https://www.encodeproject.org>), Roadmap Epigenomics (<http://www.roadmapepigenomics.org>) и TargetScan (<http://www.targetscan.org>). Статистический анализ и функциональное аннотирование SNPs проводились в лаборатории статистической генетики и биоинформатики НИИ генетической и молекулярной эпидемиологии КГМУ.

Результаты

Частоты генотипов исследованных SNPs гена *GGCT* находились в равновесии Харди-Вайнберга ($p > 0,05$). В табл. 1 представлены частоты аллелей и генотипов полиморфных вариантов гена *GGCT* в исследуемых группах. Частоты минорных аллелей (MAF) SNPs гена *GGCT* в исследуемой нами популяции были сопоставимы с таковыми в других европеоидных популяциях в соответствии с популяционно-генетическими данными проекта HapMap, представляемыми ресурсом Ensembl (<http://www.ensembl.org>): rs38420 (MAF = 0,17), rs4270 (MAF = 0,21) и rs6462210 (MAF = 0,11).

Как видно из **табл. 1**, полиморфизм rs6462210 ассоциировался с пониженным риском развития ишемического инсульта с учетом поправки на пол и возраст ($OR=0,36$ 95%CI 0,15–0,85, $p=0,01$, рецессивная генетическая модель). Статистически значимых различий в частотах аллелей и генотипов других SNPs между группами больных ИИ и здоровых не установлено ($p>0,05$).

Полиморфные варианты *GGCT* находились в неравновесии по сцеплению друг с другом: rs38420 с rs4270 ($D'=0,749$, $D=-0,034$, $p<0,01$), rs38420 с rs6462210 ($D'=0,966$, $D=-0,027$, $p<0,01$), rs4270 с rs6462210 ($D'=0,311$, $D=0,034$, $p<0,01$). В **таблице 2** представлены гаплотипы гена *GGCT* в группах больных ИИ и контроля. В частности, установлено шесть гаплотипов гена *GGCT* с частотой не менее 1%. Статистически значимых различий в частотах других гаплотипов между группами больных ИИ и здоровых не наблюдалось ($p>0,05$). В отношении частого гаплотипа А-Т-С установлена тенденция его ассоциации с пониженным риском развития ИИ ($OR=0,81$ 95%CI 0,64–1,01, $p=0,057$).

Исследуемые полиморфизмы расположены в некодирующих участках гена *GGCT*: rs38420 и rs6462210 в интронах, а rs4270 – в 3'-нетранслируемом регионе. В этой связи принципиально важной задачей исследования было функциональное аннотирование SNPs с использованием биоинформатических инструментов и ресурсов. В **таблице 3** представлены сводные данные

результатов функционального аннотирования SNPs гена *GGCT*. Базы данных eQTLGen, GTEx portal and QTLbase позволили выявить, что исследуемые полиморфные варианты имеют статистически значимые *cis* (т.е. в пределах +/- 2Mb от места локализации SNPs) eQTLs – локусы, ассоциированные с экспрессией гена *GGCT* и/или рядом расположенных генов в различных видах тканей и типов клеточек. В первую очередь нас интересовали клетки и ткани, которые могут иметь отношение к формированию атеросклеротического процесса (артерии, клетки крови), а также различные области и ткани головного мозга, подвергающиеся ишемическому повреждению вследствие окклюзии церебральных артерий.

Так, согласно данным портала GTEx, аллель G SNP rs38420 ассоциирован со снижением экспрессии гена *GGCT* в мозжечке ($p=2,6\times 10^{-11}$), базальных ганглиях ($p=1,4\times 10^{-9}$), коре мозга ($p=1,1\times 10^{-7}$), большеберцовой артерии ($p=0,000026$) и крови ($p=0,000039$). Биоинформатический анализ с использованием ресурса QTLbase установил, что SNP rs38420 имеет несколько eQTLs, ассоциированных с изменением экспрессии генов *GGCT*, *CRHR2* и *GARS-DT* в коре префронтальной области мозга ($p=0,00005$), ($p=4,31\times 10^{-05}$) и ($p=4,52\times 10^{-37}$), соответственно, а также гена *GARS-DT* в лимфоцитах ($p=7,69\times 10^{-19}$). Ресурс eQTLGen выявил статистически значимые eQTLs SNP rs38420 в крови, ассоциированные с транскрипционной активностью (аллель А ассоциировался с увеличением экспрессии генов

Таблица 1

Ассоциации полиморфных вариантов гена гамма-глутамилциклотрансферазы с риском развития ИИ

SNP ID	Генотип, аллель	N (%)		p	FDR	OR (95 CI)*
		Контроль (N=688)	Больные ИИ (N=600)			
rs38420, G>A	G/G	436 (63,5)	393 (66,7)	0,24	0,36	1,00
	G/A	221 (32,2)	179 (30,4)			0,90 (0,70–1,14)
	A/A	30 (4,4)	17 (2,9)			0,62 (0,34–1,15)
	A	0,205	0,181	0,13	0,39	0,86 (0,70–1,05)
rs4270, T>C	T/T	402 (58,7)	347 (59,8)	0,82	0,82	1,00
	T/C	235 (34,3)	197 (34)			0,97 (0,76–1,23)
	C/C	48 (7,0)	36 (6,2)			0,87 (0,55–1,37)
	C	0,242	0,232	0,57	0,72	0,95 (0,79–1,14)
rs6462210, C>T	C/C	511 (74,4)	432 (73,3)	0,02	0,06	1,00
	C/T	154 (22,4)	150 (25,5)			1,15 (0,89–1,49)
	T/T	22 (3,2)	7 (1,2)			0,37 (0,16–0,88)
	T	0,144	0,139	0,72	0,72	0,96 (0,77–1,20)

* Отношения шансов, скорректированные на пол и возраст (кодминантная генетическая модель).

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

генов) *GGCT* ($p=2,28 \times 10^{-17}$) и *CRHR2* ($p=2,29 \times 10^{-15}$). Аллель С SNP rs4270 был ассоциирован только со снижением экспрессии гена *GGCT* в ткани желудка, в то время как в артериальных сосудах, таких как аорта ($p=2,4 \times 10^{-12}$), большеберцовые ($p=1,8 \times 10^{-9}$) и коронарные ($p=0,0000085$) артерии данный аллель был связан с увеличением экспрессии гена *NOD1* (данные GTEx портала).

Согласно данным ресурса QTLbase, альтернативный аллель С полиморфизма rs4270 ассоциируется с увеличением экспрессии гена *GGCT* в крови ($p=1,0 \times 10^{-120}$), а также увеличением экспрессии гена *NOD1* в аорте ($6,49 \times 10^{-08}$) и большеберцовой артерии ($p=1,34 \times 10^{-06}$). Ресурс eQTLGen позволил выявить статистически значимые eQTLs для SNP rs4270 в крови в отношении увеличения экспрессии (влияние аллеля С) генов *GGCT* ($p=3,27 \times 10^{-310}$) и *NOD1* ($p=1,04 \times 10^{-39}$), а также снижения экспрессии гена

GARS ($p=2,54 \times 10^{-8}$). По результатам анализа портала GTEx аллель Т SNP rs6462210 ассоциировался с увеличением экспрессии гена *GGCT* в культивированных фибробластах ($p=1,4 \times 10^{-7}$) и коже ($p=0,0000029$). Согласно данным ресурса QTLbase, аллель Т также был ассоциирован с увеличением экспрессии гена *GGCT* в фибробластах ($p=2,07 \times 10^{-05}$), в то время как аллель С rs6462210 был ассоциирован со снижением экспрессии генов *GGCT* ($p=6,01 \times 10^{-09}$) и *GARS-DT* ($p=2,04 \times 10^{-15}$) в CD14+ моноцитах крови. Экспрессия гена *NOD1* ($p=0,0007$) и *GGCT* ($p=0,001$) в крови также коррелировала с SNP rs6462210. Данный полиморфизм также был ассоциирован с уровнем экспрессии генов *GARS-DT* CD4+ Т-клеток ($p=4,64 \times 10^{-05}$) и CD16+ нейтрофилов ($p=0,002$) крови.

С помощью онлайн-ресурса QTLbase также обнаружены статистически значимые sQTLs – сплайсинговые локусы количественных признаков, которые посред-

Таблица 2

Ассоциации гаплотипов гена гамма-глутамилциклотрансферазы с риском развития ИИ

Гаплотипы	rs38420	rs4270	rs6462210	Контроль (N=688)	Больные ИИ (N=600)	p	FDR	OR (95%CI)*
H1	G	T	C	0,4858	0,5288	-	-	1,00
H2	A	T	C	0,1930	0,1693	0,057	0,29	0,81 (0,64 – 1,01)
H3	G	C	C	0,1669	0,1519	0,18	0,42	0,85 (0,66 – 1,08)
H4	G	T	T	0,0794	0,0704	0,25	0,42	0,82 (0,58 – 1,15)
H5	G	C	T	0,0635	0,0684	0,87	0,91	0,97 (0,69 – 1,38)
H6	A	C	C	0,0102	0,0113	0,91	0,91	0,94 (0,31 – 2,88)
H7	A	C	T	0,0012	0,0000	-	-	-
H8	A	T	T	0,0000	0,0000	-	-	-

Уровень значимости ассоциации гаплотипов, $p=0,43$

* Отношения шансов, скорректированные на пол и возраст.

Таблица 3

Функциональное аннотирование SNPs гена гамма-глутамилциклотрансферазы с помощью различных биоинформатических инструментов

SNP ID	Аллели	Уровень экспрессии (eQTL анализ)								sQTL (QTLbase)	Связывание микроРНК	Эпигенетическая регуляция					
		Кровь			Артерии, аорта		Ткани мозга					Модификация гистонов	Открытый хроматин	Связывание CTCF	Метилирование ДНК (mQTL)		
		GTEx	eQTLGen	QTLbase	GTEx	QTLbase	GTEx	QTLbase	Кровь						Артерии, аорта	Ткани мозга	
rs38420	G/A	√	√	-	√	√	√	√	√	-	√	√	√	√	-	√	
rs4270	T/C	-	√	√	-	-	-	-	√	√	√	-	-	√	-	-	
rs6462210	C/T	-	-	√	-	-	-	-	-	-	√	-	-	-	-	-	

ством включения или выключения интронов могут регулировать альтернативный сплайсинг и формировать различные изоформы фермента в тканях. В отношении полиморфизма rs38420 установлены два статистически значимых sQTLs в головном мозге — один ассоциирован с экспрессией гена *GGCT* ($p=1,27 \times 10^{-16}$), другой — гена *GARS-DT* ($p=1,58 \times 10^{-10}$). Для SNP rs38420 установлены sQTLs гена *GGCT* в большеберцовой артерии ($p=1,0 \times 10^{-35}$), коронарной артерии ($p=5,6 \times 10^{-11}$), аорте ($p=7,2 \times 10^{-25}$), мозжечке ($p=1,1 \times 10^{-16}$), коре мозга ($p=2,4 \times 10^{-13}$), базальных ганглиях ($p=3,5 \times 10^{-11}$) и других отделах мозга (данные порталов GTEx и QTLbase). В отношении SNP rs4270 выявлен единственный sQTL в крови для гена *GGCT* ($p=2,0 \times 10^{-7}$). Также с помощью ресурса SNP Nexus нами установлено, что SNP rs4270 расположен в 3'-нетранслирующейся области гена *GGCT*, которая имеет участие связывания для микроРНК hsa-miR-1246.

Согласно данным проекта Roadmap Epigenomics все три SNPs расположены в области генома, подвергающейся модификацией гистонов, в результате которой ослабляется транскрипционная активность гена *GGCT* в аорте и различных отделах головного мозга, а именно: в передней части хвостатого ядра мозга, угловой извилине, дорзолатеральной части префронтальной коры головного мозга, срединной части гиппокампа, черной субстанции и в астроцитах. Кроме того, согласно данным проекта ENCODE, полиморфизм rs38420 ассоциирован со снижением экспрессии гена *GGCT* в астроцитах головного мозга (мозжечка) вследствие изменения чувствительности хроматина к дезоксирибонуклеазе и связывания с CTCF (CCCTC-связывающимся фактором) — репрессором транскрипции.

С использованием ресурса QTLbase в отношении двух полиморфных вариантов rs38420 и rs4270 гена *GGCT* выявлены локусы метилирования (mQTL) — участки метилирования ДНК (так называемые CpG-островки), уровень метилирования которых ассоциируется с определенными вариантами в геноме. Так, SNP rs38420 коррелировал с повышенным уровнем метилирования CpG-участков на хромосоме 7 cg07186765 ($p=2,02 \times 10^{-16}$), cg07186765 ($p=1,28 \times 10^{-13}$), cg07186765 ($p=8,27 \times 10^{-11}$), cg07186765 ($p=1,08 \times 10^{-9}$), cg23780937 ($p=3,73 \times 10^{-9}$) в клетках крови и cg21491201 ($p=5,34 \times 10^{-20}$) в коре префронтальной области головного мозга. Полиморфный вариант rs4270 гена коррелировал с уровнем метилирования в участках cg22476897 ($p=2,05 \times 10^{-10}$) и cg22476897 ($p=1,35 \times 10^{-08}$) в крови.

Обсуждение

Привлекательность гена *GGCT* как объекта для анализа ассоциаций с риском развития ИИ обусловлена

патогенетической значимостью дефицита глутатиона для формирования как атеросклеротического процесса в целом [15], так и для развития ишемического повреждения головного мозга вследствие каротидного атеросклероза [16] в частности. Согласно базе данных KEGG PATHWAY Database (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>), фермент *GGCT* вовлечен в метаболизм глутатиона — катализирует предпоследнюю стадию его катаболизма, посредством превращения гамма-глутамилдипептидов в 5-оксопролин и L-цистеин, который, в свою очередь, является предшественником для синтеза глутатиона. Также известно, что 5-оксопролин является предшественником L-глутамата (эта реакция катализируется ферментом OPLAH — АТФ-гидролизующей 5-оксопролиназой), который, являясь нейротрансмиттером в синапсах коры головного мозга, оказывает возбуждающее действие на нервные клетки и может вызывать их гибель при избыточном накоплении в межклеточном пространстве [17].

В рамках настоящего исследования впервые установлено, что полиморфные варианты гена *GGCT* могут быть связаны с развитием ИИ. Нами установлено, что интронный полиморфизм rs6462210 ассоциирован с пониженным риском развития ИИ независимо от пола и возраста пациентов. Кроме того, частый гаплотип rs38420A-rs4270T-rs6462210C показал тенденцию в ассоциации с пониженным риском развития болезни. Как известно, наибольшие трудности вызывает патофизиологическая интерпретация выявляемых ассоциаций ДНК-маркеров с мультифакториальными заболеваниями. Следует отметить, что, ассоциации полиморфных вариантов генов, расположенных в некодирующих участках генома в подавляющем большинстве исследований различных мультифакториальных заболеваний практически не интерпретируются авторами. В связи с тем, что исследованные нами полиморфизмы расположены в некодирующих участках гена *GGCT* — в интронах (rs38420 и rs6462210) и 3'-нетранслируемой области (rs4270), в настоящей работе нами был предпринят всесторонний биоинформатический анализ регуляторного потенциала посредством функционального аннотирования SNPs. Было установлено, что все три полиморфизма являются функционально значимыми, способными оказывать влияние на экспрессию не только гена *GGCT*, но и соседних генов, находящихся в неравновесии по сцеплению.

Результаты проведенного нами функционального аннотирования полиморфных вариантов в целом указывают на тот факт, что фенотипические эффекты исследованных SNPs, по всей видимости, характеризуются ослаблением экспрессии гена *GGCT* в первую очередь в клетках крови и артериях. Так, протектив-

ный эффект генотипа TT SNP rs6462210 в отношении риска развития ИИ можно объяснить тем, что данный генотип связан с увеличением экспрессии гена *GGCT*, по крайней мере, в клетках крови, тем самым обеспечивая достаточную выработку L-цистеина и, следовательно, поддерживая биосинтез глутатиона из его предшественника. Однако в тканях головного мозга, как показывает результаты анализа *in silico*, SNP rs6462210 не усиливает транскрипционную активность гена *GGCT*, а, напротив, связан со снижением экспрессии гена вследствие эпигенетических модификаций гистонов.

Связь SNP rs6462210 с риском развития ИИ может быть также объяснена функциональными эффектами SNP rs38420, с которым данный полиморфизм находится в тесном неравновесии по сцеплению ($D'=0,966$). Обнаруженный нами тренд в ассоциации частого гаплотипа rs38420A-rs4270T-rs6462210C (*H2*) с пониженным риском ИИ можно объяснить тем, что аллель A SNP rs38420 связан с увеличением экспрессии гена *GGCT* в артериях и различных отделах головного мозга, указывая на возможность активного воспроизводства предшественника глутатиона при условии такого *cis*-сочетания аллелей у отдельных индивидов.

Заслуживают внимания также литературные данные, свидетельствующие, что при ИИ в сыворотке крови имеет место увеличение уровня микроРНК hsa-miR-1246 [18], которая способна блокировать экспрессию *GGCT* посредством связывания с ДНК-мотивом в 3'-нетранслируемой области, охватывающей SNP rs4270 (данный участок связывания нами был предсказан *in silico*), что, в конечном счете, может быть причиной снижения образования предшественника глутатиона.

В связи с тем, что интронный SNP rs38420 статистически значимо ассоциирован с sQTLs гена *GGCT* в артериях и различных отделах головного мозга, можно предположить возможность образования посредством альтернативного сплайсинга тканеспецифических изоформ фермента, обладающих уникальными функциональными свойствами, которые могут иметь значение для активности процесса катаболизма глутатиона. Несомненно, что данное предположение требует экспериментальной проверки.

Наконец, нами было установлено, что наряду с увеличением экспрессии гена *GGCT* аллель A SNP rs38420 также ассоциировался с увеличением транскрипционной активности гена *CRHR2* – рецептора кортикотропин-рилизинг гормона 2-го типа, через который, как известно, опосредуются провоспалительные эффекты различных транскрипционных факторов и регуляторов (например, NF- κ B) на артериальные сосуды,

что приводит к развитию и прогрессированию атеросклероза [19].

В настоящем исследовании впервые показано, что вариабельность гена *GGCT* может вносить вклад в развитие ИИ. Необходимы экспериментальные исследования по оценке регуляторного потенциала полиморфных вариантов гена *GGCT* для патофизиологической интерпретации выявленных ассоциаций. Будущие исследования в других популяциях мира позволят проверить, насколько полиморфные варианты гена *GGCT* вовлечены в патогенез ИИ и могут оказывать влияние на тяжесть его проявления.

Литература

1. Feigin V.L., Lawes C.M., Bennett D.A., Anderson C.S. Stroke epidemiology: a review of population-based studies of incidence, prevalence, and case-fatality in the late 20th century. *Lancet Neurol.* 2003;2(1):43-53.
2. Hassan A., Markus H.S. Genetics and ischaemic stroke. *Brain.* 2000;123 (Pt 9):1784-1812.
3. Dichgans M. Genetics of ischaemic stroke. *Lancet Neurol.* 2007;6(2):149-161.
4. Allen C.L., Bayraktutan U. Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke. *Int J Stroke.* 2009;4(6):461-470.
5. Ciancarelli I., Di Massimo C., De Amicis D., Carolei A., Tozzi Ciancarelli M.G. Evidence of redox imbalance in post-acute ischemic stroke patients. *Curr Neurovasc Res.* 2012;9(2):85-90.
6. Chehaibi K., Trabelsi I., Mahdouani K., Slimane M.N. Correlation of Oxidative Stress Parameters and Inflammatory Markers in Ischemic Stroke Patients. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2016;25(11):2585-2593.
7. Kölsch H., Linnebank M., Lütjohann D., Jessen F., Wüllner U., Harbrecht U., Thelen K.M., Kreis M., Hentschel F., Schulz A., von Bergmann K., Maier W., Heun R. Polymorphisms in glutathione S-transferase omega-1 and AD, vascular dementia, and stroke. *Neurology.* 2004;63(12):2255-2260.
8. Türkanoglu A., Can Demirdögen B., Demirkaya S., Bek S., Adali O. Association analysis of GSTT1, GSTM1 genotype polymorphisms and serum total GST activity with ischemic stroke risk. *Neurol Sci.* 2010;31(6):727-34.
9. Bilgin E., Can Demirdögen B., Türkanoglu Özçelik A., Demirkaya Ş, Adali O. Association analysis of Glutathione S-transferase omega-1 and omega-2 genetic polymorphisms and ischemic stroke risk in a Turkish population. *Neurol Res.* 2019;41(2):118-124.
10. Voetsch B., Jin R.C., Bierl C., Benke K.S., Kenet G., Simioni P., Ottaviano F., Damasceno V.P., Annichino-Bizacchi J.M., Handy D.E., Loscalzo J. Promoter polymorphisms in the plasma glutathione peroxidase (GPx-3) gene: a novel risk factor for arterial ischemic stroke among young adults and children. *Stroke.* 2007;38(1):41-49.
11. Polonikov A., Vialykh E., Vasil'eva O., Bulgakova I., Bushueva O., Ilig T., Solodilova M. Genetic variation in glutathione S-transferase genes and risk of nonfatal cerebral stroke in patients suffering from essential hypertension. *J Mol Neurosci.* 2012;47(3):511-513.
12. Lee B.J., Marchionni L., Andrews C.E., Norris A.L., Nucifora L.G., Wu Y.C., Wright R.A., Pevsner J., Ross C.A., Margolis R.L., Sawa A., Nucifora F.C. Jr. Analysis of differential gene expression mediated by clozapine in human postmortem brains. *Schizophr Res.* 2017;185:58-66.
13. Пономаренко И.В. Отбор полиморфных локусов для анализа ассоциаций при генетико-эпидемиологических исследованиях. Научный результат. Медицина и фармация. 2018;(4):40-54.

14. Solé X., Guinó E., Valls J., Iniesta R., Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*. 2006;22(15):1928-1929.
15. Callegari A., Liu Y., White C.C., Chait A., Gough P., Raines E.W., Cox D., Kavanagh T.J., Rosenfeld M.E. Gain and loss of function for glutathione synthesis: impact on advanced atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(11):2473-2482.
16. Shimizu H., Kiyohara Y., Kato I., Kitazono T., Tanizaki Y., Kubo M., Ueno H., Ibayashi S., Fujishima M., Iida M. Relationship between plasma glutathione levels and cardiovascular disease in a defined population: the Hisayama study. *Stroke*. 2004;35(9):2072-2077.
17. Zhou Y., Danbolt N.C. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *J Neural Transm (Vienna)*. 2014;121(8):799-817.
18. Li P., Teng F., Gao F., Zhang M., Wu J., Zhang C. Identification of circulating microRNAs as potential biomarkers for detecting acute ischemic stroke. *Cell Mol Neurobiol*. 2015;35(3):433-447.
19. Wu Y., Zhang R., Zhou C., Xu Y., Guan X., Hu J., Xu Y., Li S. Enhanced expression of vascular cell adhesion molecule-1 by corticotrophin-releasing hormone contributes to progression of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Atherosclerosis*. 2009;203(2):360-370.
8. Türkanoglu A., Can Demirdögen B., Demirkaya S., Bek S., Adali O. Association analysis of GSTT1, GSTM1 genotype polymorphisms and serum total GST activity with ischemic stroke risk. *Neurol Sci*. 2010;31(6):727-34.
9. Bilgin E., Can Demirdögen B., Türkanoglu Özçelik A., Demirkaya Ş, Adali O. Association analysis of Glutathione S-transferase omega-1 and omega-2 genetic polymorphisms and ischemic stroke risk in a Turkish population. *Neurol Res*. 2019;41(2):118-124.
10. Voetsch B., Jin R.C., Bierl C., Benke K.S., Kenet G., Simioni P., Ottaviano F., Damasceno B.P., Annichino-Bizacchi J.M., Handy D.E., Loscalzo J. Promoter polymorphisms in the plasma glutathione peroxidase (GPx-3) gene: a novel risk factor for arterial ischemic stroke among young adults and children. *Stroke*. 2007;38(1):41-49.
11. Polonikov A., Vialykh E., Vasil'eva O., Bulgakova I., Bushueva O., Il'lig T., Solodilova M. Genetic variation in glutathione S-transferase genes and risk of nonfatal cerebral stroke in patients suffering from essential hypertension. *J Mol Neurosci*. 2012;47(3):511-513.
12. Lee B.J., Marchionni L., Andrews C.E., Norris A.L., Nucifora L.G., Wu Y.C., Wright R.A., Pevsner J., Ross C.A., Margolis R.L., Sawa A., Nucifora F.C. Jr. Analysis of differential gene expression mediated by clozapine in human postmortem brains. *Schizophr Res*. 2017;185:58-66.
13. Ponomarenko I.V. Otkor polimorfnykh lokusov dlya analiza assotsiativnykh pri genetiko-epidemiologicheskikh issledovaniyakh [Selection of polymorphic loci for association analysis in genetic-epidemiological studies]. *Nauchnyy rezul'tat. Meditsina i farmatsiya [Scientific result. Medicine and pharmacy]*. 2018; (4): 40-54. (In Russ.)
14. Solé X., Guinó E., Valls J., Iniesta R., Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*. 2006;22(15):1928-1929.
15. Callegari A., Liu Y., White C.C., Chait A., Gough P., Raines E.W., Cox D., Kavanagh T.J., Rosenfeld M.E. Gain and loss of function for glutathione synthesis: impact on advanced atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(11):2473-2482.
16. Shimizu H., Kiyohara Y., Kato I., Kitazono T., Tanizaki Y., Kubo M., Ueno H., Ibayashi S., Fujishima M., Iida M. Relationship between plasma glutathione levels and cardiovascular disease in a defined population: the Hisayama study. *Stroke*. 2004;35(9):2072-2077.
17. Zhou Y., Danbolt N.C. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *J Neural Transm (Vienna)*. 2014;121(8):799-817.
18. Li P., Teng F., Gao F., Zhang M., Wu J., Zhang C. Identification of circulating microRNAs as potential biomarkers for detecting acute ischemic stroke. *Cell Mol Neurobiol*. 2015;35(3):433-447.
19. Wu Y., Zhang R., Zhou C., Xu Y., Guan X., Hu J., Xu Y., Li S. Enhanced expression of vascular cell adhesion molecule-1 by corticotrophin-releasing hormone contributes to progression of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Atherosclerosis*. 2009;203(2):360-370.

References

1. Feigin V.L., Lawes C.M., Bennett D.A., Anderson C.S. Stroke epidemiology: a review of population-based studies of incidence, prevalence, and case-fatality in the late 20th century. *Lancet Neurol*. 2003;2(1):43-53.
2. Hassan A., Markus H.S. Genetics and ischaemic stroke. *Brain*. 2000;123 (Pt 9):1784-1812.
3. Dichgans M. Genetics of ischaemic stroke. *Lancet Neurol*. 2007;6(2):149-161.
4. Allen C.L., Bayraktutan U. Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke. *Int J Stroke*. 2009;4(6):461-470.
5. Ciancarelli I., Di Massimo C., De Amicis D., Carolei A., Tozzi Ciancarelli M.G. Evidence of redox unbalance in post-acute ischemic stroke patients. *Curr Neurovasc Res*. 2012;9(2):85-90.
6. Chehaibi K., Trabelsi I., Mahdouani K., Slimane M.N. Correlation of Oxidative Stress Parameters and Inflammatory Markers in Ischemic Stroke Patients. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2016;25(11):2585-2593.
7. Kölsch H., Linnebank M., Lütjohann D., Jessen F., Wüllner U., Harbrecht U., Thelen K.M., Kreis M., Hentschel F., Schulz A., von Bergmann K., Maier W., Heun R. Polymorphisms in glutathione S-transferase omega-1 and AD, vascular dementia, and stroke. *Neurology*. 2004;63(12):2255-2260.