

Отсутствие ассоциации полиморфизма rs6339 гена нейротрофинового рецептора тирозинкиназы типа 1 с шизофренией в армянской популяции

Захарян Р.В.^{1,*}, Телумян Е.Г.¹, Геворгян А.П.², Аракелян А.А.¹

¹ Институт молекулярной биологии Национальной академии наук Республики Армения, ул. Асратян 7, Ереван, 0014, Армения

² Центр медицинской диагностики «Альфа-бетта», ул. Московян 24, Ереван 0002, Армения

Шизофрения — многофакторное полигенное расстройство, характеризующееся как генетической компонентой, так и воздействием факторов окружающей среды. Информация относительно ключевых генетических вариантов ассоциированных с данной патологией год из года пополняется новыми данными. В настоящей работе мы исследовали возможную ассоциацию шизофрении с однонуклеотидным полиморфизмом rs6339 гена *NTRK1*, кодирующего нейротрофиновый рецептор тирозинкиназы типа 1. С этой целью образцы ДНК, выделенные из крови больных шизофренией и здоровых лиц, были генотипированы методом полимеразной цепной реакции с аллельспецифичными праймерами. Результаты проведенного исследования показали отсутствие ассоциации между риском развития шизофрении и исследованным однонуклеотидным полиморфизмом, что, однако, не исключает вовлечение других генетических вариаций этого гена или близлежащих полиморфизмов в патогенез шизофрении.

Ключевые слова: шизофрения, ген нейротрофинового рецептора тирозинкиназы типа 1, однонуклеотидный полиморфизм, генотипирование.

Автор, ответственный за переписку с редакцией: Захарян Роксана Владиславовна. Армения, г. Ереван, 0014, ул. Асратяна, 7, Институт молекулярной биологии НАН РА, e-mail: r_zakharyan@mb.sci.am, zakharyanr@gmail.com

Благодарность. Авторы выражают благодарность администрации и врачам психиатрических клиник МЗ РА за содействие в проведении настоящего исследования. Работа выполнена в рамках базового финансирования, предоставленного Государственным комитетом по науке Республики Армения, за что авторы выражают глубокую благодарность.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Lack of association of rs6339 polymorphism of the neurotrophic tyrosine kinase receptor 1 with schizophrenia in Armenian population

Zakharyan R.V.¹, Telumyan E.H.¹, Gevorgyan A.P.², Arakelyan A.A.¹

¹Institute of Molecular Biology of the National Academy of Sciences of the Republic of Armenia; e-mail: r_zakharyan@mb.sci.am

²Diagnosic medical center «Alfa betta»

Schizophrenia is a multifactorial polygenic disease characterized by both genetic and environmental components. There is growing information about the genetic variations contributing to schizophrenia. In the current study we aimed to explore the potential association of single nucleotide polymorphism rs6339 of the *NTRK1* gene with schizophrenia. For this purpose, DNA samples isolated from the blood of patients with schizophrenia and healthy individuals were genotyped using polymerase chain reaction with allele-specific primers. The obtained results demonstrated no association between schizophrenia development risk and the studied genetic variant. However, the absence of association found in this study does not exclude the association of other genetic polymorphisms of this gene or nearby locus with schizophrenia.

Key words: schizophrenia, neurotrophic tyrosine kinase receptor 1, single nucleotide polymorphism, genotyping.

Введение

Нейротрофины — взаимосвязанные белки, способствующие выживанию, дифференцировке и функционированию периферических нейронов и нейронов центральной нервной системы, включая образование синапсов и их пластичность [1, 2]. Данное семейство включает фактор роста нервов (NGF), нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), нейротрофины (NT)-3 и NT4/5 [1, 2].

К числу психиатрических заболеваний с частично описанным этиопатогенезом относится шизофрения (ШФ), многофакторное расстройство, характеризующееся как генетической компонентой, так и воздействием факторов окружающей среды [3]. Несмотря на почти вековые интенсивные исследования молекулярных основ ШФ, информация относительно ключевых генетических вариантов год из года пополняется новыми сведениями.

Наши прежние исследования показали ассоциацию ШФ с полиморфизмами генов, кодирующих такие члены семейства нейротрофинов, как нейрональный фактор роста NGF (nerve growth factor), его высокоаффинный рецептор NGFR и нейротрофический фактор мозга BDNF (brain-derived neurotrophic factor)]. В частности, выявлены генетические варианты, наследование которых повышает риск заболеваемости ШФ [4–7]. Также было выявлено, что низкие по сравнению с нормой уровни белка BDNF у больных данной патологией обусловлены наличием полиморфизма rs6265 соответствующего гена [7].

Ген нейротрофинового рецептора тирозинкиназы типа 1 (*NTRK1*), известного также как TrkA, Trk1, входит в состав семейства тирозинкиназных рецепторов [1, 2, 8]. Следует отметить, что нейротрофины проявляют выборочную специфичность к взаимодействиям с членами вышеотмеченного семейства рецепторов. К настоящему времени наиболее подробно изучены три нейротрофина: NGF, который связывается с высокой аффинностью с *NTRK1*; BDNF, связывающийся с нейротрофинным рецептором тирозинкиназы типа 2 — *NTRK2* (также известного как TrkB), и NT3, который способен связываться как с *NTRK2*, так и с рецептором типа 3 (*NTRK3*, TrkC). Связываясь с вышеотмеченными рецепторами, нейротрофины активируют их, способствуя, таким образом, передаче сигнала в регулируемых ими сигнальных путях [1, 2, 8].

Ранее было показано, что минорный аллель однонуклеотидного полиморфизма rs6336 гена *NTRK1* может служить фактором риска развития ШФ в трех европейских популяциях [9]. В отличие от этого полиморфизма, функциональный полиморфизм rs6339 гена *NTRK1* не исследован при данной патологии.

Целью данной работы явился поиск ассоциации риска развития ШФ с полиморфизмом rs6339 вышеотмеченного гена методом генотипирования образцов геномной ДНК больных ШФ и здоровых лиц с последующим сравнительным анализом полученных данных.

Материалы и методы

Субъектами данного исследования являлись больные параноидной формой ШФ, диагностированные врачами психиатрических клиник Министерства здравоохранения Республики Армения (МЗ РА) на основе критериев Международной классификации болезней (МКБ-10; код: F20.0) [10]. Контрольную группу составляли физически и психически здоровые лица — доноры Медицинского центра Эребуни МЗ РА и Института молекулярной биологии Национальной академии наук РА. Согласно результатам опросников, никто из здоровых лиц, вовлеченных в данное исследование, не имел какого-либо психического заболевания или наследственной отягощенности. В целом, в исследование было вовлечено 106 больных ШФ, принимавших типичные нейролептики (мужчины/женщины: 76/30; средний возраст

($M \pm \delta$): $45,09 \pm 10,9$ года; средняя длительность заболевания ($M \pm \delta$): $17,45 \pm 10,2$ года; возраст первой манифестации заболевания: $30,58 \pm 10,5$ года) и 140 здоровых лиц (мужчины/женщины: 70/70; средний возраст ($M \pm \delta$): $49,8 \pm 11,2$ года). Все субъекты исследования были этническими армянами, проживающими на территории РА.

Все субъекты были проинформированы врачами о предстоящем исследовании и дали согласие на взятие 10 мл венозной крови. Исследование одобрено Комитетом по этике Института молекулярной биологии НАН РА (международный номер регистрации 00004079).

Забор крови проводили пункцией из локтевой вены в пробирки, содержащие в качестве антикоагулянта ЭДТА. Выделение ДНК из крови проводили модифицированным методом высаливания с использованием хлороформа [11]. Образцы ДНК хранили при -30°C .

Выбор однонуклеотидного полиморфизма исследуемого гена основан на его функциональной роли в соответствии с базой данных Национального центра биотехнологической информации США (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Принимая во внимание тот факт, что кодирующий полиморфизм rs6336 (замена гистидина на тирозин) уже был исследован при ШФ, наш выбор остановился на однонуклеотидном полиморфизме rs6339 гена *NTRK1*. Известно, что данный полиморфизм приводит к замене гуанина (G) на тимин (T), что, в свою очередь, соответствует замене глицина на валин в положении 577 полипептидной цепи (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Генотипирование образцов ДНК больных ШФ и здоровых лиц по выбранному полиморфизму проводили с использованием полимеразной цепной реакции с аллель-специфичными праймерами, согласно ранее описанным условиям [12]. Дизайн праймеров был проведен с использованием базы данных «GenBank» (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). В результате были получены и использованы праймеры со следующими нуклеотидными последовательностями: обратный праймер для стандартного rs6339C аллеля, 5'-ATGCCAAGCTGCTGGCTGG-3'; обратный праймер для мутантного rs6339*Г аллеля 5'-ATGCCAAGCTGCTGGCTGT-3'; прямой константный праймер 5'-GTTGCGTGTGGCCAGGTC-3'. Для 10% произвольно выбранных образцов генотипирование проводили дважды с целью проверки воспроизводимости данных. Во всех произвольно выбранных образцах наблюдалось полное соответствие генотипов. Электрофорез продуктов амплификации ДНК проводили в 2% агарозном геле в 0,045 М трис-боратном буфере, pH 8,0, содержащем 0,001 М ЭДТА и 0,7 мкг/мл бромистого этидия (флуоресцентный краситель). По окончании электрофореза гель помещали на стекло трансиллюминатора, и ДНК в геле визуализировали в темноте с использованием контактной ультрафиолетовой лампы, определяя, таким образом, наличие/отсутствие аллель-специфичных ампликонов.

Группа	Генотип			Аллель		Носительство аллеля	Значение ХВ
	GG	GT	TT	G	T		
ШФ	82 (0,77)	20 (0,19)	4 (0,04)	184 (0,87)	28 (0,13)	28 (0,23)	0,07
Контроль	112 (0,80)	26 (0,19)	2 (0,01)	250 (0,89)	30 (0,11)	24 (0,20)	0,73
p					0,39	0,62	

Статистическую обработку полученных данных проводили, используя онлайн программный пакет «SISA» (<http://www.quantitativeskills.com/sisa/>). Распределение генотипов выбранного полиморфизма в исследуемых группах проверяли на соответствие закону Харди—Вайнберга. Частоту встречаемости генотипов, аллелей и носителей мутантных аллелей в исследуемых группах рассчитывали, основываясь на данных электрофореза (по числу и местоположению соответствующих полос в геле). Значимость различий по отмеченным параметрам между больными и здоровыми лицами определяли по критерию Пирсона χ^2 , рассчитывали отношение шансов (OR), 95%-ный доверительный интервал (CI) и доверительную вероятность (p). Значения $p < 0,05$ были приняты как статистически значимые. Для оценки взаимосвязи между генотипами исследуемых полиморфизмов и клинико-демографическими характеристиками больных ШФ использовали Н-тест Крускала—Уоллиса.

Результаты исследования

В таблице представлены результаты генотипирования полиморфизма rs6339 гена *NTRK1*. Согласно полученным данным, распределение генотипов по всем исследуемым полиморфизмам в группах больных ШФ и здоровых лиц соответствовало уравнению Харди—Вайнберга ($p > 0,05$).

Сравнительный анализ показал, что генотипы исследованного полиморфизма распределены практически одинаково между группами больных ШФ и здоровыми лицами. Так, частота встречаемости мутантного аллеля rs6339*Т у больных была выше, чем у здоровых лиц (0,13 vs. 0,11, $p = 0,39$). Число носителей того же аллеля среди больных ШФ было больше по сравнению со здоровыми лицами (0,23 vs. 0,20), тем не менее, отмеченные изменения не являлись статистически достоверными ($p = 0,62$).

Следует отметить, что нами не было выявлено какой-либо статистически значимой взаимосвязи между генотипами исследуемых полиморфизмов и клинико-демографическими характеристиками больных ШФ, такими, как возраст первой манифестации заболевания и его длительность ($p > 0,05$).

Обсуждение результатов

Нейротрофины — полипептиды, стимулирующие нейрональное развитие (пролиферация и выживание клеток, рост аксонов и дендритов, перенос через мембрану, образование и функционирование синапсов) и одновременно играющие роль медиаторов между иммунными и нейрональными клетками [16]. Множество исследований, включая наши собственные данные, указывают на нарушения иммунного статуса организма и аномалии нейронального развития у больных ШФ [17—19].

Как уже было отмечено выше, *NTRK1* фосфорилируется в ответ на связывание с NGF [1, 2, 8]. Показано, что замена гистидина на тирозин (rs6336) не влияет на автофосфорилирование TrkA [20], однако комбинированный эффект полиморфизмов His > Tyr (rs6336) и Gly > Val (rs6339) не исследован. Позже Van Schijndel J.E. с соавторами (2011) было выявлено, что полиморфизм rs6336 имеет двойной эффект: так, в предварительных исследованиях показано, что минорный аллель повышает риск ШФ, тогда как в репликативных исследованиях на независимых выборках данный полиморфизм может служить как фактором риска, так и иметь протекторную роль [9]. Для прояснения данного вопроса необходимо проведение метаанализа, включающего эндотипы. Остается также открытым вопрос, является ли ШФ заболеванием, связанным исключительно с дефектами нейронального развития или оно включает множество эндотипов, что должно быть также учтено при постановке диагноза.

На данный момент отсутствуют данные о роли исследованного в этой работе полиморфизма rs6339 гена *NTRK1* в других популяциях у больных, страдающих психическими заболеваниями. Тем не менее, показано, что мутации данного гена ассоциированы с врожденным отсутствием чувствительности к боли с ангидрозом (врожденная сенсорная нейропатия с ангидрозом или congenital insensitivity to pain with anhidrosis), одним из симптомов которой являются проблемы умственного развития, характерные также для больных ШФ [3, 13].

Несмотря на тот факт, что ассоциации rs6339 с заболеванием в данной работе не выявлено, это не исключает вовлечение других генетических вариаций этого гена или близлежащих локусов в патогенез ШФ. Более того, данный полиморфизм может быть ассоциирован с ШФ

в других популяциях. Различные эффекты одного и того же полиморфизма в разных популяциях могут быть результатом как этнических особенностей, так и взаимодействия генетической компоненты и факторов окружающей среды. Учитывая тот факт, что гены обычно сгруппированы в семейства, выполняющие схожие биологические функции, другие полиморфизмы гена *NTRK1* могут находиться в неравновесном сцеплении с полиморфизмами взаимодействующих с *NTRK1* генов.

Список литературы

- Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci.* 2001; 24: 677-736.
- Chao MV. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci.* 2003; 4: 299-309.
- Palomo T, Archer T, Kostrzewa RM, et al. Gene-environment interplay in schizopsychotic disorders. *Neurotox Res.* 2004; 6(1): 1-9.
- Zakharyan R, Boyajyan A, Arakelyan A, et al. Functional variants of the genes involved in neurodevelopment and susceptibility to schizophrenia in Armenian population. *Hum Immunol.* 2011; 72(9): 746-748.
- Boyajyan A, Zakharyan R, Khoyetsyan A Chapter XI. Molecular and genetic indicators of aberrant immunity and apoptosis in schizophrenia In: *Schizophrenia research: Recent advances* (Editor: T. Sumiyoshi), Nova Science Publishers Inc., USA, 2012, pp. 183-240.
- Zakharyan R, Atshemyan S, Gevorgyan A, et al. Nerve growth factor and its receptor in schizophrenia. *BBA Clinical* 2014; 1: 24-29.
- Zakharyan R, Boyajyan A. Brain-derived neurotrophic factor blood levels are decreased in schizophrenia patients and associate with rs6265 genotypes. *Clin Biochem.* 2014; 47(12): 1052-1055.
- Wiesmann C, de Vos AM. Nerve growth factor: structure and function. *Cell. Mol. Life Sci.* 2001; 58: 748-759.
- Van Schijndel JE, Van Zweeden M, Van Loo KM, et al. Dual association of a TRKA polymorphism with schizophrenia. *Psychiatr Genet.* 2011; 21(3): 125-131.
- The international statistical classification of diseases and related health problems. 1992, World Health Organization, Geneva, 1243-10.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988; 16: 1215.
- Bunce M, O'Neill CM, Barnardo MC, et al. Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB3, DRB4, DRB5&DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP). *Tissue Antigens.* 1995; 46: 355-367.
- Indo Y. Molecular basis of congenital insensitivity to pain with anhidrosis (CIPA): mutations and polymorphisms in TRKA (*NTRK1*) gene encoding the receptor tyrosine kinase for nerve growth factor. *Hum Mutat.* 2001; 18(6): 462-471.
- Yeo GS, Connie Hung CC, Rochford J, et al. A de novo mutation affecting human TrkB associated with severe obesity and developmental delay. *Nat Neurosci.* 2004; 7(11): 1187-1189.
- Hariri AR, Goldberg TE, Mattay VS, et al. Brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism affects human memory-related hippocampal activity and predicts memory performance. *J Neurosci.* 2003; 23(17): 6690-6694.
- Vega JA, Garcia-Suarez O, Hannestad J, et al. Neurotrophins and the immune system. *J Anat.* 2003; 203(1): 1-19.
- Fatemil SH, Folsom TD. The neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia, revisited. *Schizophr Bull.* 2009; 35: 528-548.
- Zakharyan R, Khoyetsyan A, Arakelyan A, et al. Association of C1QB gene polymorphism with schizophrenia in Armenian population. *BMC Med Genet.* 2011; 12(1): 126.
- Zakharyan R, Boyajyan A. Inflammatory cytokine network in schizophrenia. *World J Biol Psychiatry.* 2014; 15(3): 174-187.
- Mardy S, Miura Y, Endo F, et al. Congenital insensitivity to pain with anhidrosis (CIPA): effect of TRKA (*NTRK1*) missense mutations on autophosphorylation of the receptor tyrosine kinase for nerve growth factor. *Hum Mol Genet.* 2001; 10: 179-188.