

Эволюционно-генетический анализ роли регуляторных участков гена *NDRG1* в формировании структуры наследственной предрасположенности к преэклампсии в популяциях различного этнического происхождения

Сереброва В.Н., Трифонова Е.А., Степанов В.А.

Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, vika.serebrova@medgenetics.ru

Регуляторные однонуклеотидные полиморфные варианты (rSNP) представляют большой интерес для исследователей, поскольку играют значимую роль в развитии различных патологических состояний человека путем изменения уровня экспрессии кандидатных генов, однако относятся к наименее изученной функциональной группе SNP. Целью данного исследования было изучение генетической компоненты преэклампсии (ПЭ) по системе rSNP нового гена-кандидата *NDRG1* и выявление роли естественного отбора в ее формировании. В представленной работе изучено четыре rSNP. Исследование проводилось в различных этнических группах (русские, якуты и буряты). Полученные данные показали ассоциацию с развитием ПЭ трех rSNP гена *NDRG1*: rs12678229, rs2227262 и rs3802252. Выявлено действие слабого отрицательного отбора для rs2227262. Результаты исследования могут свидетельствовать о значимой роли rSNP нового гена-кандидата *NDRG1* в формировании вариабельности уровня экспрессии плацентарной ткани при физиологично протекающей беременности и ПЭ.

Ключевые слова: преэклампсия, регуляторный однонуклеотидный полиморфный вариант (rSNP), ассоциативное исследование, плацента, транскриптому, естественный отбор.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 14-04-01467). Экспериментальные исследования проведены на базе Центра коллективного пользования научно-исследовательским оборудованием и экспериментальным биологическим материалом «Медицинская геномика» (НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ).

Evolutionary-genetic analysis of the role of regulatory regions in *NDRG1* gene in the formation of the hereditary predisposition structure to preeclampsia in different ethnic groups

Serebrova V.N.*, Trifonova E.A., Stepanov V.A.

Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

Regulatory single nucleotide polymorphisms (rSNPs) are of substantial interest, because they play a significant role in the development of human pathology by altering the level of candidate genes expression. However they represent the least studied group of single nucleotide polymorphisms (SNPs). The purpose of this research was to study preeclampsia (PE) genetics components via the regulatory polymorphic variants of the new *NDRG1* candidate gene and to detect the role of natural selection in its formation. In this work, we analyzed four rSNPs. Three ethnic group have been studied (Yakut, Russian, Buryat). We have detected significant associations of PE with three rSNPs *NDRG1* gene: rs12678229, rs2227262 and rs3802252. We demonstrated the effect of weak negative selection for rs2227262. The results of this study provide evidence for a significant role of the new *NDRG1* candidate gene in the variability of the placental tissue expression between normal pregnancy and PE.

Keywords: preeclampsia, regulatory single-nucleotide polymorphisms (rSNPs), association study, placenta, transcriptome, natural selection.

Введение

Результаты молекулярно-генетических исследований свидетельствуют о том, что генофонд современного человека отражает историю адаптации к изменениям окружающей среды во время доисторических миграций за пределы Африки и, как правило, является специфичным для отдельных регионов. Изучение адаптивных из-

менений в человеческом геноме, возникших в условиях новой среды обитания, необходимо для понимания процессов формирования генетического разнообразия в современных популяциях, оценки роли их фенотипических проявлений в развитии болезней и здоровья современного человека, а также может рассматриваться в ка-

честве способа обнаружения «упущенной наследуемости» при многофакторных заболеваниях (МФЗ) [1–3].

В представленной работе эволюционный подход к анализу генетической архитектуры МФЗ конкретизирован в отношении преэклампсии (ПЭ), которая из-за отсутствия в настоящее время предсказательных биомаркеров и эффективной фармакологической терапии признана одним из наиболее тяжелых гипертензивных расстройств беременности, определяющих высокую частоту материнской и перинатальной заболеваемости и смертности [4]. Поскольку плацента играет ведущую роль в этиопатогенезе ПЭ, все большее внимание исследователей направлено на изучение транскриптома плацентарной ткани при ПЭ и физиологично протекающей беременности, что позволило на сегодняшний день выявить ряд новых генов-кандидатов данной патологии в популяциях различного этнического происхождения [5, 6]. Было показано, что регуляция экспрессии кандидатных генов отчасти обеспечивается полиморфными вариантами, располагающимися в регуляторных последовательностях генов (rSNP) [7, 8], которые также играют значимую роль в развитии различных патологических состояний человека [8]. Определенный интерес в контексте ведущей роли плаценты в развитии ПЭ представляет эволюционный подход к анализу генетической архитектуры данной патологии по системе генов, вовлеченных в молекулярные процессы, происходящие в плацентарной ткани. Важно отметить, что развитие ПЭ характерно прежде всего для человека, однако имеются редкие сообщения о возникновении данной патологии у обезьян: горилл, шимпанзе, макак [9].

В данной работе была поставлена цель — охарактеризовать генетическую архитектуру ПЭ по системе rSNP нового гена-кандидата *NDRG1*, показавшего дифференциальную экспрессию в плацентарной ткани при ПЭ и физиологично протекающей беременности [6, 10, 11] и выявить роль естественного отбора в ее формировании.

Материалы и методы

В исследование было включено 1270 женщин, принадлежащих к трем этническим выборкам: якуты из г. Якутск (группа больных ПЭ, N = 217 чел., контрольная

группа, N = 210 чел.), буряты из г. Улан-Удэ (группа больных ПЭ, N = 140 чел., контрольная группа, N = 205 чел.), русские из г. Томск (группа больных ПЭ, N = 195 чел., контрольная группа, N = 303 чел.). Группа больных ПЭ включала пациенток с умеренной и тяжелой степенью ПЭ. Диагноз *преэклампсия* установлен врачами-акушерами в соответствии с Международной классификацией болезней 10-го пересмотра (МКБ-10). Контрольная группа представлена женщинами с физиологично протекавшей беременностью и родами, а также отсутствием неблагоприятного акушерского анамнеза. Материал был собран на базе МАУЗ «Родильный дом №4» и ОГАУЗ «Областной перинатальный центр» г. Томска, Перинатального центра РБ №4 г. Якутска и ГБУЗ «Республиканский перинатальный центр» г. Улан-Удэ.

Поиск наиболее значимых rSNP гена *NDRG1* проводили с использованием онлайн ресурса «RegulomeDB». Критерием отбора служили значения «score» равные 1 и 2, характеризующие степень доказательности регуляторности каждого полиморфного варианта исследуемого гена. В результате было выявлено 44 rSNP, из них 27 rSNP оказались полиморфными (частота редкого аллеля более 5% по результатам проекта «1000 геномов»). Для дальнейшего анализа были выбраны 4 rSNP, которые вошли в состав мультиплекса (табл. 1) [12]. Генотипирование проводили методом MALDI-TOF масс-спектрометрии, как описано ранее [13], последовательности праймеров доступны по запросу.

Соответствие распределения частот аллелей и генотипов равновесию Харди—Вайнберга (РХВ) проверяли по критерию χ^2 . Попарное сравнение частот аллелей и генотипов между исследуемыми группами проводили с использованием критерия χ^2 с поправкой Йейтса или точного критерия Фишера. Для оценки ассоциированности rSNP с ПЭ вычисляли отношение шансов (OR) и его 95%-ный доверительный интервал (95% CI). Обнаружение сигналов естественного отбора на макроэволюционном уровне проводилось в эволюционной линии парвотряда *Catarrhini* (человек, шимпанзе, орангутан, макака) с использованием онлайн ресурса «INSIGHT»,

Таблица 1

Характеристика исследуемых rSNP гена *NDRG1*

rSNP	Локализация rSNP		Значение "score"	Аллели	ПА
	в гене	на хромосоме			
rs12678229	Инtron	133262775	1f	A/G	G
rs2227262	Инtron	133247931	2b	C/T	C
rs2977559	Инtron	133247165	1f	A/G	A
rs3802252	Инtron	133293282	1f	C/T	T

Примечание. Значение «score» базы данных «RegulomeDB», характеризующее степень доказательности регуляторности SNP, обозначено цифровыми и буквенными символами; Наибольшими регуляторными свойствами обладают rSNP со значением «score» равным 1a (регуляторные свойства уменьшаются с увеличением цифрового значения и в алфавитном порядке). Локализация rSNP определена согласно данным базы NSBI. ПА — предковый аллель.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

основанного на методе комбинации межвидовой дивергенции и внутривидового разнообразия [14].

Проведение настоящего исследования одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ.

Результаты исследования

В обследованных этнических выборках все исследуемые rSNP гена *NDRG1* оказались полиморфными. Отклонение от РХВ было выявлено в группе контроля (русские — rs2227262; якуты — rs2227262, rs3802252; буряты — rs2977559), с учетом поправки Бонферрони ни одно из отклонений от РХВ не достигало порогового уровня значимости ($p = 0,0125$). В табл. 2 представлены результаты распределения частот аллелей изученных rSNP в исследуемых этнических выборках.

В якутской популяции ассоциация с развитием ПЭ показана для двух rSNP: rs2227262 и rs3802252. Так, для rs2227262 наблюдается статистически значимое повышение частоты генотипа TT ($p = 0,01$, OR = 0,09; CI:0,01–0,73) и аллеля T ($p = 0,01$, OR = 0,60; CI:0,40–0,90) в контрольной группе, что указывает на их протективные свойства. В то же время, показано статистически значимое повышение частоты аллеля C ($p = 0,01$, OR = 1,66; CI:1,11–2,48) в группе больных ПЭ. Для rs3802252 при ПЭ характерно статистически значимое повышение частоты встречаемости аллеля T ($p = 0,02$, OR = 1,37; CI:1,05–1,80) и снижение частоты встречаемости аллеля C ($p = 0,02$, OR = 0,73; CI:0,55–0,96) при сравнении с физиологично протека-

ющей беременностью. В этнической выборке бурятов статистически значимое повышение частоты генотипа GG ($p = 0,04$, OR = 1,93; CI:1,10–3,41) и аллеля G ($p = 0,02$, OR = 1,45; CI:1,06–1,97), а также снижение частоты аллеля A ($p = 0,02$, OR = 0,69; CI:0,51–0,94) rs12678229 наблюдалось в группе больных ПЭ. В этнической выборке русских не было установлено статистически значимых различий при сравнении группы больных с ПЭ и контрольной группы.

При оценке влияния естественного отбора на исследуемые rSNP среди представителей эволюционной линии парвотряда Catarrhini (человека, шимпанзе, орангутана, макаки) не было обнаружено действия сильного очищающего и положительного отбора; было показано действие слабого очищающего отбора для rs2227262 (табл. 3), что свидетельствует о консервативности данного полиморфного варианта среди представителей изученной эволюционной линии, благодаря удержанию производного аллеля в популяции на низком уровне. Примечательно, что в этнической выборке якутов для rs2227262 при ПЭ наблюдается значимое повышение частоты предкового аллеля C, в то время как производный аллель T и генотип TT обладают протективными свойствами.

Обсуждение

В представленной работе был проведен эволюционно-генетический анализ роли rSNP нового гена-кандидата *NDRG1* в формировании структуры наследственной предрасположенности к ПЭ. Анализ распределения час-

Таблица 2
Распределения частот (%) аллелей rSNP в исследуемых группах

rSNP	ПА	Обследованные группы					
		ПЭ			Контроль		
		Буряты	Русские	Якуты	Буряты	Русские	Якуты
rs12678229	G	50	58	44	41	59	48
rs2227262	C	86	86	89	86	84	84
rs2977559	A	40	43	40	40	45	38
rs3802252	T	48	44	60	48	45	52

Примечание. ПА — предковый аллель.

Таблица 3

Роль действия естественного отбора по изученным rSNP гена *NDRG1*

rSNP	ПА	Вид отбора	Уровень значимости
rs12678229	G	Не выявлено сигналов действия естественного отбора	—
rs2227262	C	Слабый очищающий отбор	$p < 0,01$
rs2977559	A	Не выявлено сигналов действия естественного отбора	—
rs3802252	T	Не выявлено сигналов действия естественного отбора	—

Примечание. ПА — предковый аллель.

тот аллелей и генотипов 4-х генов исследуемого гена показал статистически значимую ассоциацию с развитием ПЭ для трех генов: rs12678229 в этнической выборке бурятов; rs2227262 и rs3802252 в этнической выборке якутов. Поиск сигналов естественного отбора в эволюционной линии парвотряда *Catarrhini* выявил действие слабого очищающего отбора, направленного на ген rs2227262.

Ген *NDRG1* впервые выявлен благодаря анализу транскриптома плацентарной ткани [6, 10, 11]. Примечательно, что на сегодняшний день отсутствуют данные о роли его гена в развитии ПЭ. Продуктом гена является цитоплазматический белок суперсемейства гидролаз, участвующий в различных биологических процессах: клеточной пролиферации и дифференцировке, гормональном ответе. При воздействии стресса, например, гипоксии, белок *NDRG1* может играть цитопротективную роль в нормальных здоровых клетках [15]. Важно отметить, что среди семейства белков *NDRG* именно изоформа *NDRG1* наиболее активно экспрессируется в плаценте во втором и третьем триместрах беременности, преимущественно в синцитиотрофобласте [16]. Показано, что повышенный уровень экспрессии гена *NDRG1* в условиях гипоксии способствует дифференцировке и уменьшению степени повреждения клеток трофобласта [17], что согласуется с результатами нескольких исследований транскриптома плацентарной ткани, которые демонстрируют повышение уровня экспрессии гена *NDRG1* при ПЭ [6, 10, 11].

Результаты недавних исследований свидетельствуют о том, что в линии предков человекообразных обезьян происходит увеличение инвазивных свойств плаценты. Так, например, для семейств Cercopithecoidea (мартышка, макака и др.) и Hylobatidae (гibbon) характерны малая глубина инвазии трофобласта и отсутствие ремоделирования спиральных артерий на более глубоких уровнях миометрия. В то же время, для представителей подсемейства Hominidae (человека, шимпанзе, гориллы, орангутана) характерны глубокая инвазия трофобласта и ремоделирование спиральных артерий, проходящее в миометрии [18]. Выявленное в нашем исследовании действие слабого очищающего отбора свидетельствует о консервативном характере регуляторного полиморфного варианта rs2227262 в ряду представителей эволюционной линии парвотряда *Catarrhini*. Такой тип отбора способствует удержанию производных аллелей на низком уровне. Примечательно, что ассоциация с развитием ПЭ для данного полиморфного варианта показана в этнической выборке якутов для предкового аллеля С, в то время как производный аллель Т обладает протективными свойствами. Можно предположить, что предковый аллель С регуляторного полиморфного варианта rs2227262 обеспечивает необходимый уровень экспрессии гена *NDRG1* в условиях гипоксии при неглубокой инвазии трофобласта, однако для представителей семейства Hominidae ее уровень может быть недостаточ-

ным, поскольку вследствие увеличения инвазивных свойств плаценты клетки трофобласта чаще подвергаются действию гипоксии, что приводит к их повреждению и, как, следствие к развитию ПЭ.

В представленной работе показана статистически значимая ассоциация с развитием ПЭ трех генов *NDRG1* в этнических группах бурятов и якутов, что может свидетельствовать о важной роли регуляторных полиморфных вариантов в формировании вариабельности уровня экспрессии плацентарной ткани при ПЭ и физиологично протекающей беременности, а также о возможном вкладе слабого очищающего отбора в формирование наследственной предрасположенности к данной патологии беременности по rs2227262 в этнической выборке якутов. Для более полного понимания роли генов нового гена-кандидата *NDRG1* и вклада естественного отбора в формирование структуры наследственной предрасположенности к ПЭ необходимо расширить список изучаемых генов, увеличить объем исследуемых выборок, а также включить дополнительные этнические выборки.

Список литературы

- Степанов ВА. Эволюция генетического разнообразия и болезни человека. Генетика. 2016;52(7):852-864.
- Saez AT, Al-Naqeb D. The Impact of Evolutionary Driving Forces on Human Complex Diseases: A Population Genetics Approach. Scientifica (Cairo). 2016;doi:10.1155/2016/2079704.
- Scheinfeldt LB, Tishkoff SA. Recent human adaptation: genomic approaches, interpretation and insights. Nat.Rev.Genet. 2013;14(10):692-702.
- Tannetta D, Sargent I. Placental disease and the maternal syndrome of preeclampsia: missing links? Curr.Hypertens.Rep. 2013;15(6):590-599.
- Louwen F, Muschol-Steinmetz C, Reinhard J, et al. A lesson for cancer research: placental microarray gene analysis in preeclampsia. Oncotarget. 2012;3(8):759-773.
- Трифонова ЕА, Габидулина ТВ, Ершов НИ, и др. Характеристика транскриптома плацентарной ткани у женщин с физиологической беременностью и преэклампсией. Acta Naturae. 2014;6(2):77-90.
- Антонцева ЕВ, Брызгалов ЛО, Матвеева МЮ, и др. Поиск регуляторных SNPs, связанных с развитием рака толстой кишки, в генах APC и MLH1. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2011;15(4):644 — 652.
- Jones BL, Swallow DM. The impact of cis-acting polymorphisms on the human phenotype. Hugo J. 2011;5(1-4):13-23.
- Elliot M.G. Oxidative stress and the evolutionary origins of preeclampsia. J.Reprod.Immunol. 2016;114:75-80.
- Nishizawa H, Ota S, Suzuki M, et al. Comparative gene expression profiling of placentas from patients with severe pre-eclampsia and unexplained fetal growth restriction. Reprod.Biol.Endocrinol. 2011;doi:10.1186/1477-7827-9-107.
- Sitras V, Paulsen RH, Gronaa H, et al. Differential placental gene expression in severe preeclampsia. Placenta. 2009;30(5):424-433.
- Сереброва ВН, Трифонова ЕА, Габидулина ТВ, и др. Выявление новых маркеров предрасположенности к преэклампсии путем анализа регуляторных участков генов, демонстрирующих дифференциальную экспрессию в плацентарной ткани. Молекулярная биология. 2016;50(5):870-879.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

13. Степанов ВА, Трифонова ЕА. Мультиплексное генотипирование однонуклеотидных полиморфных маркеров методом масс-спектрометрии MALDI-TOF: частоты 56 SNP в генах иммунного ответа в популяциях человека. Молекулярная биология. 2013;47(6):976-986.
14. Gronau I, Arbiza L, Mohammed J, et al. Inference of natural selection from interspersed genomic elements based on polymorphism and divergence. Mol.Biol.Evol. 2013;30(5):1159-1171.
15. Ellen TP, Ke Q, Zhang P, et al. NDRG1, a growth and cancer related gene: regulation of gene expression and function in normal and disease states. Carcinogenesis. 2008;29(1):2-8.
16. Choi SJ, Oh SY, Kim JH, et al. Increased expression of N-myc downstream-regulated gene 1 (NDRG1) in placentas from pregnancies complicated by intrauterine growth restriction or preeclampsia. Am.J Obstet.Gynecol. 2007;196(1):45.e1-7.
17. Chen B, Nelson DM, Sadovsky Y. N-Myc downregulated gene 1 (Ndrg1) modulates the response of term human trophoblasts to hypoxic injury. J.Biol.Chem. 2006;281(5):2764-2772.
18. Crosley EJ, Elliot MG, Christians JK. Placental invasion, preeclampsia risk and adaptive molecular evolution at the origin of the great apes: evidence from genome-wide analyses. Placenta. 2013;34(2):127-132.