

В.Е. ДОСЕНКО<sup>1</sup>, Д. МИХАЛЬЧУК<sup>1</sup>, В.Ю. ЗАГОРИЙ<sup>1</sup>,  
А.Н. ПАРХОМЕНКО<sup>2</sup>, А.А. МОЙБЕНКО<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, Киев

<sup>2</sup> Институт кардиологии им. Н.Д. Стражеско АМН Украины, Киев  
E.mail: dosenko@biph.kiev.ua

## ЧАСТОТА АЛЛЕЛЬНОГО ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СУБЪЕДИНИЦЫ ИММУНОПРОТЕАСОМЫ, У БОЛЬНЫХ С ОСТРЫМ КОРОНАРНЫМ СИНДРОМОМ



*Представлены результаты определения аллельного полиморфизма генов, кодирующих большие мультифункциональные протеазы LMP2 (Arg60 → His) и LMP7 (Lys145 → Gln), у 200 больных с острым коронарным синдромом и 80 здоровых индивидуумов. Установлено, что соотношение генотипов Arg/Arg, Arg/His и His/His при анализе полиморфизма гена LMP2 составило 52; 40,5 и 7,5 % соответственно (в контроле — 53,8; 38,7; 7,5 %; P > 0,05 по  $\chi^2$ -критерию). Распределение аллельных вариантов гена LMP7 было следующим: Lys/Lys — 89,5 %, Lys/Gln — 10,5 %, Gln/Gln — 0 % (в контроле — 93,8; 6,2; 0 % соответственно; P > 0,05). Полученные данные свидетельствуют о том, что полиморфизм генов, кодирующих каталитические субъединицы протеасомы, не влияет на вероятность развития острого коронарного синдрома в украинской популяции.*

© В.Е. ДОСЕНКО, Д. МИХАЛЬЧУК, В.Ю. ЗАГОРИЙ,  
А.Н. ПАРХОМЕНКО, А.А. МОЙБЕНКО, 2005

**Введение.** Роль протеасомального протеолиза в патогенезе атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний, развивающихся на его основе, активно изучается в последние годы [1, 2]. Показано, что протеасомальное расщепление внутриклеточных белков играет существенную роль в регуляции обмена липопротеидов, экспрессии молекул клеточной адгезии, апоптозе гладкомышечных и эндотелиальных клеток, т.е. в процессах, имеющих принципиальное значение в атерогенезе [1, 3–5]. Получены данные о возможности применения ингибиторов протеасомы для предупреждения формирования неоинтимы после денудации артерий, рестеноза артериальных сосудов после баллонной дилатации, ишемически-реперфузионных повреждений и инсультов [2, 6, 7].

Среди многих теорий развития атеросклероза одними из наиболее актуальных считаются аутоиммунная и инфекционная концепция патогенеза этого патологического процесса [8, 9]. Иммунный ответ как на собственные антигены, так и на чужеродные предусматривает презентацию антигенов в составе белков главного комплекса гистосовместимости (МНС). Последний процесс практически невозможен без участия так называемой иммунопротеасомы, которая образуется в результате замены трех конституциональных каталитических субъединиц в коровой части протеасомы на три индуцибельные субъединицы — большие мультифункциональные протеазы (LMP2, LMP7 и LMP10) [6, 10]. В генах, кодирующих LMP2 и LMP7, описан полиморфизм единичных нуклеотидов (SNP) и предпринимаются попытки установить влияние аллельного полиморфизма указанных генов на вероятность развития тех или иных заболеваний [11–16]. В частности установлено, что более редкий аллельный вариант гена LMP2 значительно чаще встречается у больных с некоторыми аутоиммунными заболеваниями [14, 15]. Данных о роли аллельного полиморфизма генов LMP2 и LMP7 в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний на сегодняшний день нет.

Исходя из вышеизложенного, мы предприняли попытку определить частоту аллельного полиморфизма генов, кодирующих субъединицы иммунопротеасомы, у больных с острым коронарным синдромом (ОКС) с целью установления возможной ассоциации между ал-

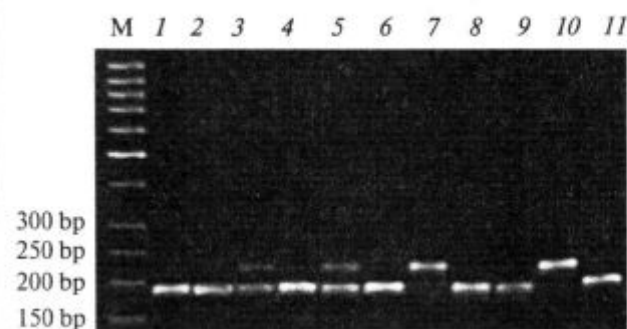
лельными вариантами LMP2 и LMP7 и вероятностью развития ОКС.

**Материалы и методы.** В основу настоящей работы положены результаты обследования 200 больных с острым коронарным синдромом (81,7 % мужчин и 18,3 % женщин) в возрасте от 40 до 83 лет (средний возраст  $58,5 \pm 0,7$  года), госпитализированных в отделение реанимации и интенсивной терапии Института кардиологии им. Н.Д. Стражеско АМН Украины. Заключительный диагноз нестабильной стенокардии (НС) выставлен 33,5 % больных, острого инфаркта миокарда (ИМ) — 66,5 % больных. Диагноз острого ИМ и НС устанавливали на основании данных клинических, электрокардиографических и биохимических обследований, согласно рекомендациям экспертов ВОЗ, а также в соответствии с рекомендациями Европейского и Американского обществ кардиологов [17—19]. Контрольную группу составили 80 практически здоровых доноров, у которых отсутствие сердечно-сосудистой патологии подтверждали путем сбора анамнестических данных, снятия электрокардиограммы и измерения артериального давления. Контрольная группа и группа больных не отличались по возрасту и соотношению полов,  $P > 0,05$  по  $\chi^2$ -критерию.

Для генотипирования венозную кровь забирали в стерильных условиях в моноветты объемом 2,7 мл с калиевой солью этилендиаминтетрауксусной кислоты в качестве антикоагулянта («Sarstedt», Германия), замораживали и сохраняли при температуре при  $-20^\circ\text{C}$ . ДНК выделяли из цельной крови с использованием наборов «Изоген» (Россия). Методом полимеразной цепной реакции с последующим анализом длины рестрикционных фрагментов определяли Arg60→His полиморфизм гена LMP2 с модификациями [16]. Для этого амплифицировали участок указанного гена с помощью пары специфических праймеров: прямой (sense) — 5'-CTTGAAC CAGGGAGGCGAAGTTTG-3' и обратный (antisense) — 5'-CAGCTGAACCAGAGAGTGC ATAGT-3' («Синтол», Россия). Для амплификации брали 50—100 нг ДНК и добавляли к смеси, содержащей 5 мкл пятикратного PCR-буфера, 1,5 мМ сульфата магния, 200 мкМ смеси четырех нуклеотидтрифосфатов, по 20 рМ каждого из праймеров и 0,5 ед. Taq-полимера-

зы («АмплиСенс», Россия), объем доводили до 25 мкл деионизированной водой. PCR проводили в термоциклере «GeneAmp System 2700» («Applied Biosystems», США). Амплификация фрагмента промотора состояла из 35 циклов: денатурация —  $94^\circ\text{C}$  (1 мин), отжиг праймеров —  $63^\circ\text{C}$  (30 с) и элонгация —  $74^\circ\text{C}$  (1 мин). В дальнейшем 6 мкл продукта амплификации фрагмента гена инкубировали при  $37^\circ\text{C}$  в течение 18 ч с 2 ед. рестриктазы Hin6I («Fermentas», Литва) в буфере  $Y^+$  следующего состава: 33 мМ трис-ацетата (pH 7,9), 10 мМ ацетата магния, 66 мМ ацетата калия, 0,1 мг/мл сывороточного альбумина быка (BSA) или с 2 ед. рестриктазы Alw21I в буфере  $O^+$  следующего состава: 50 мМ трис-ацетата (pH 7,5), 10 мМ хлорида магния, 100 мМ хлорида натрия, 0,1 мг/мл BSA («Fermentas», Литва). Если в положении гена LMP2 находился гуанидин, то ампликат, состоящий из 228 пар оснований, расщеплялся рестриктазой Hin6I на два фрагмента — 199 и 29 пар оснований. В случае замены гуанидина на аденин сайт рестрикции для Hin6I теряется, а для рестриктазы Alw21I, наоборот, появляется, и образуются два фрагмента указанного размера (рис. 1).

Аллельный полиморфизм гена LMP7 (Lys 145→Gln полиморфизм) определяли также путем амплификации фрагмента и последующей рестрикции [16]. Последовательность нуклеотидов в специфических праймерах была следующей: прямой (sense) — 5'-CGGACA



**Рис. 1.** Результаты электрофореза фрагмента гена LMP2 после рестрикции с использованием фермента Hin6I: М — маркер молекулярной массы (bp — пары нуклеиновых оснований), дорожки 1, 2, 4, 6, 8, 9, 11 соответствуют Arg/Arg-генотипу, 3, 5 — Arg/His-генотипу, 7 и 10 — His/His-генотипу

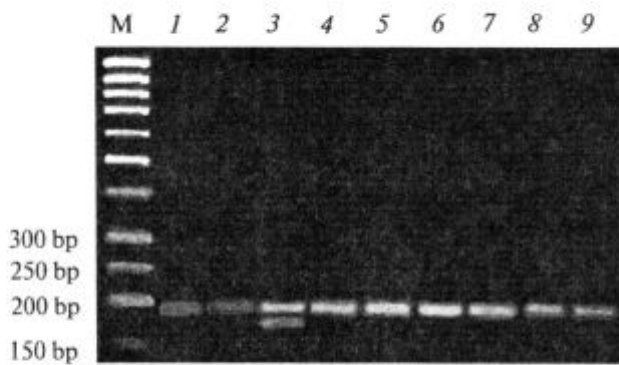


Рис. 2. Результаты электрофореза фрагмента гена LMP7 после рестрикции с использованием фермента MvaI269I: М — маркер молекулярной массы (bp — пары нуклеиновых оснований), дорожки 1, 2, 4–9 соответствуют Lys/Lys-генотипу, 3 — Lys/Gln-генотипу

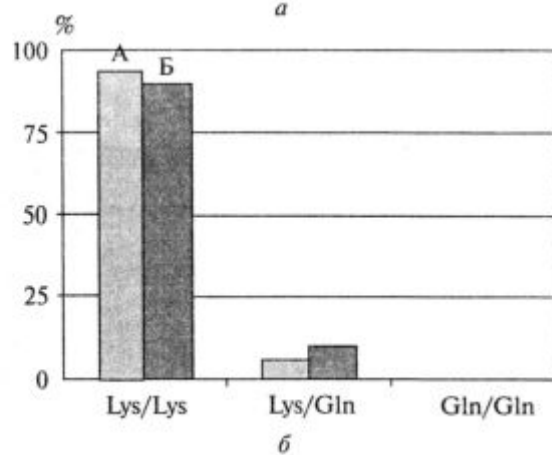
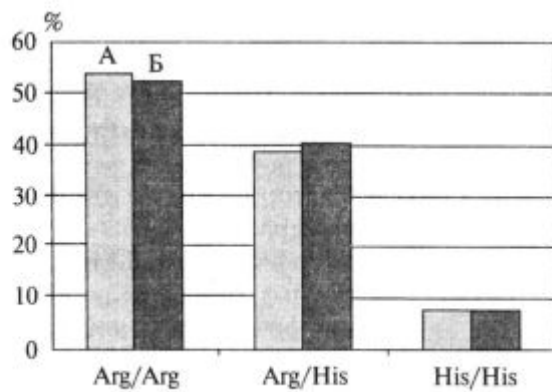


Рис. 3. Частота аллельных вариантов генов LMP2 (a) (Arg60→His полиморфизм) и LMP7 (б) (Lys145→Gln полиморфизм) у практически здоровых индивидумов (А) и больных с острым коронарным синдромом (Б)

GATCTCTGGGTGCT-3' и обратный (antisense) — 5'-CTTCCCTACTGCCCAAGCT-3'. Для амплификации брали 50–100 нг ДНК и добавляли к смеси, содержащей 5 мкл пятикратного PCR-буфера, 1,5 мМ сульфата магния, 200 мкМ смеси четырех нуклеотидтрифосфатов, по 20 рМ каждого из праймеров и 0,5 ед. Taq-полимеразы («АмплиСенс», Россия), объем доводили до 25 мкл деионизированной водой. Амплификация фрагмента гена LMP7 состояла из 38 циклов: денатурация — 94 °С, 1 мин, отжиг праймеров — 63 °С (35 с) и элонгация — 74 °С (1 мин). Для определения SNP 6 мкл продукта амплификации инкубировали при 37 °С в течение 20 ч с 5 ед. рестриктазы HindIII («СибЭнзим», Россия) в буфере следующего состава: 10 мМ трис-гидрохлорида (pH 8,5), 10 мМ хлорида магния, 100 мМ хлорида натрия, 0,1 мг/мл BSA, 1 мМ дитиотреитола или с 2 ед. рестриктазы MvaI269I в буфере R<sup>+</sup> («Fermentas», Литва). Более распространенный аллельный вариант гена LMP7 с цитозином (размер амплификата — 193 пары оснований) расщеплялся рестриктазой HindIII на два фрагмента — 179 и 14 пар оснований. В случае замены цитозина на аденин амплификат расщепляется рестриктазой MvaI269I на два фрагмента указанного размера (рис. 2).

Амплификаты фрагментов генов LMP2 и LMP7 после рестрикции разделяли в 2,5%-ном агарозном геле, содержащем бромистый этидий. Визуализацию ДНК после горизонтального электрофореза (160 В на протяжении 40 мин) проводили с помощью трансиллюминатора и программного обеспечения ViTran («Биоком», Россия).

Полученные данные обрабатывали статистически с использованием программы Excel 2000. При этом достоверность отличий определяли по  $\chi^2$ -критерию. Значение  $P < 0,05$  считали достоверным.

**Результаты исследований и их обсуждение.** Распределение частоты различных аллельных вариантов генов LMP2 и LMP7 в контрольной группе и у больных с ОКС показано на рис. 3. Соотношение генотипов Arg/Arg, Arg/His и His/His при анализе полиморфизма гена LMP2 составило 52; 40,5 и 7,5 % соответственно (в контроле — 53,8; 38,7; 7,5 %;  $P > 0,05$  по  $\chi^2$ -критерию). Аллельные варианты гена

LMP7 распределились следующим образом: Lys/Lys — 89,5 %, Lys/Gln — 10,5 %, Gln/Gln — 0 % (в контроле — 93,84 6,2; 0 % соответственно;  $P > 0,05$ ). Таким образом, среди 280 генотипированных людей не было ни одной гомозиготы (Gln/Gln), что говорит о том, что в украинской популяции этот полиморфизм гена LMP7 встречается крайне редко.

Полученные данные свидетельствуют о том, что распределение частот аллельных вариантов генов LMP2 и LMP7 не отличается в контрольной группе и в группе больных с ОКС. Прежде всего результаты исследования позволяют сделать вывод об эволюционной консервативности генов, кодирующих субъединицы иммунопротеасомы. Несмотря на то, что гены LMP2 и LMP7 расположены в чрезвычайно вариабельном участке 6-й хромосомы в комплексе с генами, которые кодируют белки МНС, на сегодняшний день описано только по одному SNP в этих генах. Последний встречается очень редко как в украинской, так и в других популяциях [11, 15, 16]. Идентичность распределения аллельных вариантов этих генов у больных с ОКС и у практически здоровых людей косвенно свидетельствует о том, что иммунные механизмы не играют ведущей роли в инициации атеросклеротического поражения коронарных сосудов. По-видимому, аллельный полиморфизм других генов, в частности эндотелиальной NO-синтазы, в гораздо большей степени влияет на вероятность развития сердечно-сосудистых заболеваний.

**SUMMARY.** Large multifunctional protease LMP2 (Arg60→His) and LMP7 (Lys145→Gln) gene allelic polymorphism in 200 patients with acute coronary syndrome and in 80 practically healthy people was determined. It was shown that interrelation of genotypes Arg/Arg, Arg/His and His/His in LMP2 gene polymorphism is 52, 40.5 and 7.5 % correspondingly (in control group 53.8, 38.7, 7.5 %;  $P > 0.05$  by  $\chi^2$ -test). Analysis of LMP7 gene polymorphism has shown that Lys/Lys — 89.5 %, Lys/Gln — 10.5 %, Gln/Gln — 0 % (in control group 93.8, 6.2, 0 % correspondingly;  $P > 0.05$ ). The data show that LMP2 and LMP7 gene polymorphism is not a risk factor of acute coronary syndrome in Ukrainian population.

**РЕЗЮМЕ.** Наведено результати визначення аллельного поліморфізму генів, що кодують великі мультифункціональні протеази LMP2 (Arg60→His) та LMP7 (Lys145→Gln), у 200 хворих на гострий коронарний

синдром і 80 здорових індивідуумів. Встановлено, що співвідношення генотипів Arg/Arg, Arg/His и His/His при аналізі поліморфізму гена LMP2 становить 52; 40,5 та 7,5 % відповідно (в контролі — 53,8; 38,7; 7,5 %;  $P > 0,05$  за  $\chi^2$ -критерієм). Розподіл алельних варіантів гена LMP7 був наступним: Lys/Lys — 89,5 %, Lys/Gln — 10,5 %, Gln/Gln — 0 % (в контролі — 93,8; 6,2; 0 % відповідно;  $P > 0,05$ ). Отримані дані свідчать про те, що поліморфізм генів, що кодують каталітичні субодиниці протеасоми, не впливає на ймовірність розвитку гострого коронарного синдрому в українській популяції.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Herrmann J., Ciechanover A., Lerman L.O., Lerman A. The ubiquitin-proteasome system in cardiovascular diseases — a hypothesis extended // *Cardiovasc. Res.* — 2004. — **61**. — P. 11–21.
- Wojcik C., di Napoli M. Ubiquitin-proteasome system and proteasome inhibition: new strategy in stroke therapy // *Stroke.* — 2004. — **35**. — P. 1506–1518.
- Dupre D.J., Chen Z., Le Gouill C. et al. Trafficking, ubiquitination, and down-regulation of the human platelet-activating factor receptor // *J. Biol. Chem.* — 2003. — **278**. — P. 48228–48235.
- Herrmann J., Gulati R., Napoli C. et al. Oxidative stress-related increase in ubiquitination in early coronary atherogenesis // *FASEB J.* — 2003. — **17**. — P. 1730–1732.
- Kikuchi J., Furukawa Y., Kubo N. et al. Induction of ubiquitin-conjugating enzyme by aggregated low density lipoprotein in human macrophages and its implications for atherosclerosis // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2000. — **20**. — P. 128–134.
- Гольдберг А., Еледж С., Гарнер Дж.В. Механізми клітинної смерті // *Світ науки.* — 2001. — № 2. — С. 32–37.
- Meiners S., Laule M., Rother W. et al. Ubiquitin-proteasome pathway as a new target for the prevention of restenosis // *Circulation.* — 2002. — **105**. — P. 483–489.
- Нагорнев В.А. Современные аспекты патогенеза атеросклероза // *Арх. патологии.* — 1991. — **53**. — С. 13–22.
- Fabricant C.G., Fabricant J., Litrenta M.M., Minick C.R. Virus-induced atherosclerosis // *J. Exp. Med.* — 1978. — **148**. — P. 335–340.
- Ehring B., Meyer T.H., Eckerskorn C. et al. Effects of major-histocompatibility-complex-encoded subunits on the peptidase and proteolytic activities of human 20S proteasomes. Cleavage of proteins and antigenic peptides // *Eur. J. Biochem.* — 1996. — **235**. — P. 404–415.
- Deng G.Y., Muir A., Maclaren N.K., She J.X. Association of LMP2 and LMP7 genes within the major histo-

- compatibility complex with insulin-dependent diabetes mellitus: population and family studies // *Amer. J. Hum. Genet.* — 1995. — 56. — P. 528—534.
12. *Dosenko V.E., Mikhalchuk D.V., Moibenko A.A.* Association between allelic variant of immunoproteasome subunits (LMP2, LMP7) and acute coronary syndrome // *The ubiquitin proteasome system in health and disease: Abstracts of Joint 59th Harden EMBO Conf.* — Cirencester, 2004. — P. 15.
  13. *Kuzushita N., Sugimoto Y., Sasaki Y., Hayashi N.* Involvement of TAP2 and LMP7 gene polymorphisms in HCV infection // *Nippon Rinsho.* — 2001. — 59. — P. 1248—1253.
  14. *Maksymowych W.P., Russell A.S.* Polymorphism in the LMP2 gene influences the relative risk for acute anterior uveitis in unselected patients with ankylosing spondylitis // *Clin. Invest. Med.* — 1995. — 18. — P. 42—46.
  15. *Pryhuber K.G., Murray K.J., Donnelly P. et al.* Polymorphism in the LMP2 gene influences disease susceptibility and severity in HLA-B27 associated juvenile rheumatoid arthritis // *J. Rheumatol.* — 1996. — 23. — P. 747—752.
  16. *Vinasco J., Fraile A., Nieto A. et al.* Analysis of LMP and TAP polymorphisms by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism in rheumatoid arthritis // *Ann. Rheum. Dis.* — 1998. — 57. — P. 33—37.
  17. *Bertrand M.E., Simoons M.L., Fox K.A.A. et al.* Management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. The task force on the management of acute coronary syndromes of the European society of cardiology // *Eur. Heart J.* — 2002. — 23. — P. 1809—1840.
  18. *Braunwald E., Antman E.M., Brooks N.H. et al.* ACC/AHA guidelines for the management of patients with unstable angina and non ST-elevation myocardial infarction: executive summary and recommendations. A report of the american college of cardiology / American Heart Association task force on practice guidelines for (committee on management of patients with unstable angina) // *Circulation.* — 2000. — 102. — P. 1193—1209.
  19. *World Health Organization.* Nomenclature and criteria for diagnosis of ischemic heart disease // *Circulation.* — 1979. — 59. — P. 607—609.

Поступила 27.04.05