

Анализ ассоциаций полиморфных вариантов сайтов связывания микроРНК с первичным остеопорозом у мужчин и женщин

Б. И. Ялаев*, Р. И. Хусаинова

*Институт биохимии и генетики Уфимского Федерального
исследовательского центра РАН*

Россия, Республика Башкортостан, 450054 г. Уфа, проспект Октября 71.

**Email: yalaev.bulat@yandex.ru*

Исследована роль полиморфных локусов сайта связывания микроРНК в мРНК генов, которые играют значительную роль в костном метаболизме, проведен поиск ассоциаций изученных локусов с риском развития остеопоротических переломов, а также с низким уровнем минеральной плотности костной ткани.

Ключевые слова: микроРНК, сайт связывания микроРНК, остеопороз, минеральная плотность костной ткани, эпигенетика, генотипирование.

Остеопороз – одно из ведущих многофакторных заболеваний человека, которое ежегодно приводит к более 8.9 млн переломов по всему миру, а по распространенности занимает значимое место среди заболеваний с высокой смертностью и инвалидизацией, таких как инфаркт миокарда, рак или инсульт [1]. Необходимо отметить, что для остеопороза характерно широкое варьирование ее распространенности, которая достигает 5–10 кратных различий между географическими регионами, что может частично объясняться 25%-вкладом генетических факторов в развитие такого эндотипа костной ткани как качество кости, отражающее состояние и параметры микроархитектоники кости [2]. При этом, установлено, что масса костной ткани, которое является наиболее значимым диагностическим критерием диагностики остеопоротических состояний, определяется вариабельностью минеральной плотности костной ткани (МПКТ), 80% которой также обусловлено генетическими факторами [3].

Однако, несмотря на тот факт, что риск переломов повышается при низком уровне МПКТ, нормальный уровень МПКТ необязательно связан с пониженным риском переломов, что говорит о том, что остеопороз – это заболевание, на развитие которого влияют большое количество генов и он может иметь достаточно сложную структуру и патогенетические варианты развития, что, к тому же, было неоднократно подтверждено недавними крупномасштабными исследованиями по полногеномному ассоциации (GWAS), а также исследованиями генетической архитектуры заболевания на основе ген-кандидатного подхода [4].

Благодаря этим исследованиям, стало понятно, что остеопоротические переломы и низкий уровень МПКТ могут быть двумя независимыми эндофенотипами остеопороза, которые могут иметь совершенно различные патогенетические пути развития. Кроме того, стало понятно, что в патогенезе остеопороза все еще остаются неизвестные звенья, которые могли бы расширить понимание картины патогенеза заболевания [5].

Прежде всего, в роли недостающего звена вполне закономерно, могут выступать эпигенетические механизмы, которые представляют собой систему наследственных изменений в экспрессии генов без изменения первичной последовательности ДНК. Большой интерес среди изучаемых, на данный момент, эпигенетических факторов остеопороза, уделяется исследованию роли микроРНК, которые регулируют посттранскрипционную экспрессию генов путем связывания с целевыми матричными РНК в сайтах, преимущественно расположенных в 3'-нетранслируемой области гена. Оказалось, что микроРНК могут играть значительную роль в развитии остеопороза, показано, что ключевые гены регуляции костного ремоделирования и костного метаболизма тесно контролируются различными вариантами микроРНК, в частности, они вовлечены в активность остеобластов и остеокластов, влияют на гормональную регуляцию ремоделирования костной ткани и др. Однако, в то же время, практически нет данных о том, как и каким образом, нарушение сродства связывания регуляторных микроРНК с ключевыми генами костного метаболизма и ремоделирования может влиять на фенотипическое проявление остеопороза. Неизвестно, насколько велик вклад полиморфизма сайтов связывания микроРНК в разных популяциях и какой он имеет эффект в целом в патогенезе остеопороза в различных регионах мира [6].

Поэтому, нами было решено исследовать ряд полиморфных локусов сайтов связывания микроРНК в генах, которые по данным различных исследований играют значительную роль в костном метаболизме или ключевых регуляторных процессах дифференциации костных клеток, и провести поиск ассоциаций изученных локусов с риском развития остеопоротических переломов, а также с низким уровнем МПКТ. Для этого были отобраны следующие локусы: rs11540149 с.*1865G>A (*VDR* – ген рецептора витамина D), rs1061947 с.*744C>T (*COL1A1* – структурный ген, кодирующий коллаген α-1), rs6854081 с.*3156T>T (*FGF2* – ген фактора роста фибробластов), rs10793442 с.*336C>G (*ZNF239* – ген белка 239 цинкового пальца, участвующий в системе регуляции активности генов), rs10098470 с.*1073C>T (*TPD52* – ген опухолевого белка 52, который согласно данным GWAS с определенной вероятностью связан с остеопорозом) и rs1712 с.*433C>T (*FBXO5* – ген белок ингибитора митоза на ранней стадии Emi 1).

Цель исследования: поиск ассоциаций полиморфных локусов rs11540149, rs1061947, rs6854081, rs10793442, rs10098470 и rs1712 с наличием или отсутствием переломов, а также остеопенией, остеопорозом и нормальными показателями у жителей Волго-Уральского региона России.

Материалы и методы исследования: выборка из коллекции ДНК пациентов с остеопорозом в количестве 1035 человек, среди которых 421 мужчина и 614 женщины в возрасте 27 до 87 лет, в основном русской, татарской этнической принадлежности, а также небольшого процента метисов и других этнических групп исследуемого региона. Выборка была разделена на группы сравнения, которые анализировались с учетом наличия/отсутствия переломов, уровня минеральной плотности костной ткани (МПКТ) шейки бедра и поясничного отдела позвоночника, измеренных методом DEXA (“Hologic”, США) и гендерной принадлежности. Характеристика групп сравнения представлена в таблице 1. Генотипирование исследуемых локусов проводилось с использованием технологии KASP-конкурентной аллель-специфической ПЦР на платформе Applied Biosystems™ QuantStudio™ с использованием калибровочного красителя Low Rox и Bio-Rad CFX96 со Standart Rox.

Таблица 1. Характеристика групп сравнения

Группы сравнения		
Пол	Мужчины	Женщины
С переломами	135	346
Без переломов	286	268
Норма	169	335
Остеопения	127	115
Остеопороз	125	164

Результаты исследования. В результате проведенной работы были обнаружены статистически значимые различия по частотам аллелей полиморфных локусов rs11540149 гена *VDR* и rs10098470 гена *TPD52*. В общей выборке мужчин аллель *А полиморфного локуса rs11540149 гена *VDR* повышал риск развития остеопоротических переломов (рис. 1).

Кроме того, аллель *А значимо ассоциирован с пониженным уровнем МПКТ ($p=0.003$), как и сумма его гомозиготных и гетерозиготных генотипов ($p=0.002$) у мужчин в целом (рис. 2).

В общей выборке мужчин (рис. 3) и выборке мужчин русской этнической принадлежности (рис. 4) с отсутствием/наличием переломов при исследовании полиморфного локуса rs10098470 гена *TPD52* аллель *А ($p=0.01$) и гомо и гетерозиготный генотипы с аллелем А ($p=0.002$) оказались рисковыми, а также ассоциированы с низким уровнем МПКТ в общей выборке мужчин (рис. 5).

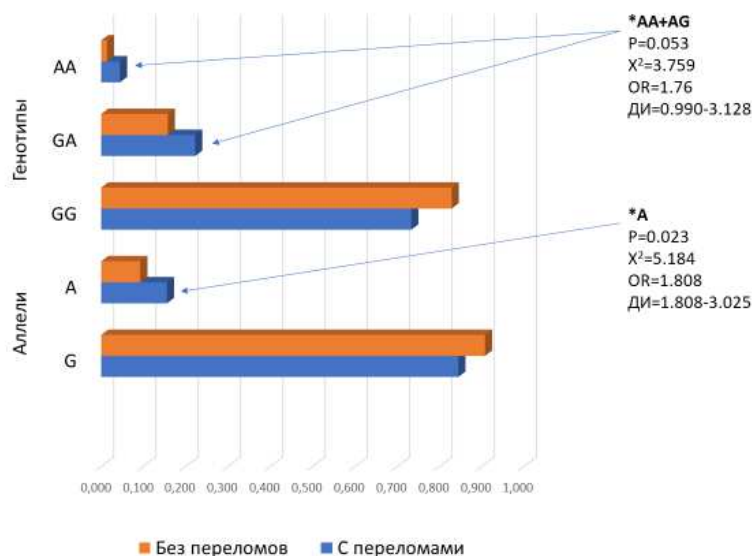


Рис. 1. Распределение частот аллелей и генотипов локуса rs11540149 гена *VDR* между общими выборками мужчин с наличием/отсутствием переломов.

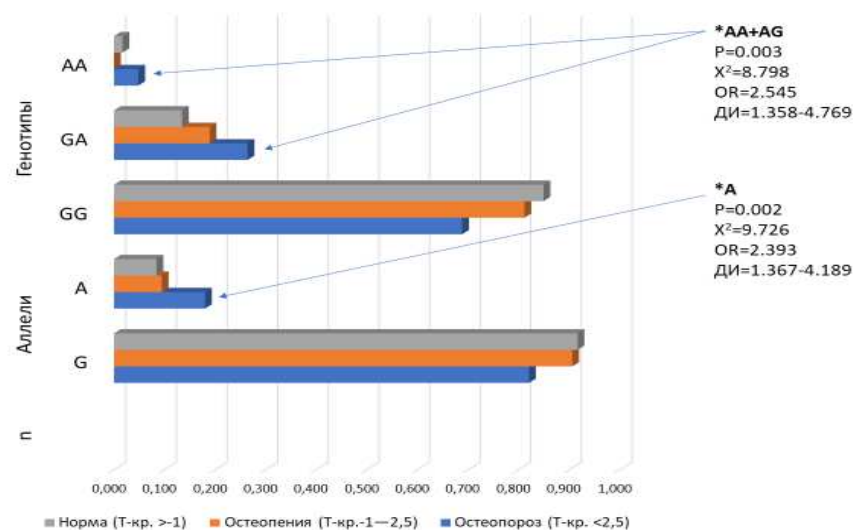


Рис. 2. Распределение частот аллелей и генотипов локуса rs11540149 гена *VDR* между общими выборками мужчин с остеопорозом/остеопенией/нормой.

Найденные ассоциации рискового аллеля *A и его генотипов полиморфного локуса rs11540149 гена *VDR* с остеопоротическими переломами, а также со снижением уровня МКПТ у мужчин, говорят о вероятном вкладе замены с.*1865G>A на активность гена *VDR*, который кодирует рецептор витамина D₃, отвечает за минеральный обмен и гомеостаз кальция и фосфора. Известно, что исследуемый локус rs11540149 с.*1865G>A является сайтом связывания для микроРНК для нескольких регуляторных микроРНК, например hsa-miR-150-5p, hsa-miR-629-3p, hsa-miR-532-3p и др. Предполагается, что

однонуклеотидная замена с*1865G>A приводит к ухудшению связывания матричной РНК с короткими интерферирующими микроРНК, что и приводит к нарушению активности гена. При этом у женщин не обнаружено таких закономерностей, что подтверждает существование гендерных различий в формировании патогенеза остеопороза. Найденная ассоциация аллеля *Т полиморфного варианта rs10098470 (с.*1073C>T) гена *TPD52* с переломами и низким уровнем МПКТ вероятно связана с нарушением сродства данного участка с неконсервативными сайтами связывания микроРНК при аллеле *Т, однако механизм влияния данного аллеля на формирование данного фенотипа остается неизвестным.

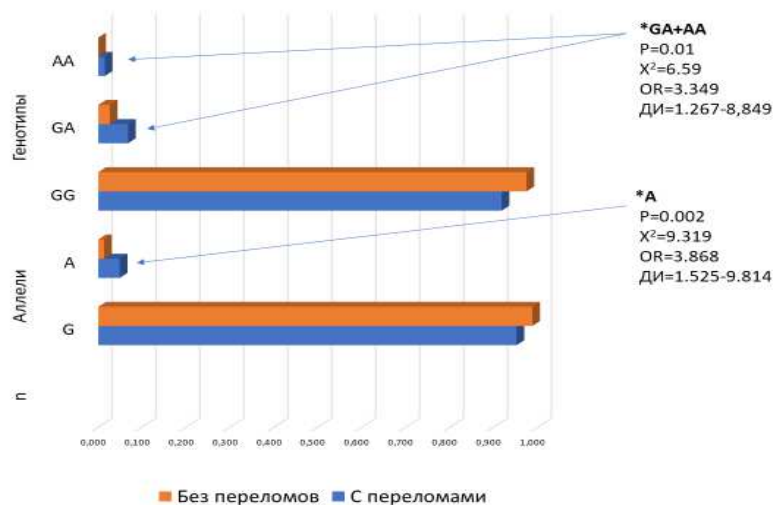


Рис. 3. Распределение частот аллелей и генотипов локуса rs10098470 гена *TPD52* между общими выборками мужчин с отсутствием/наличием перелома.

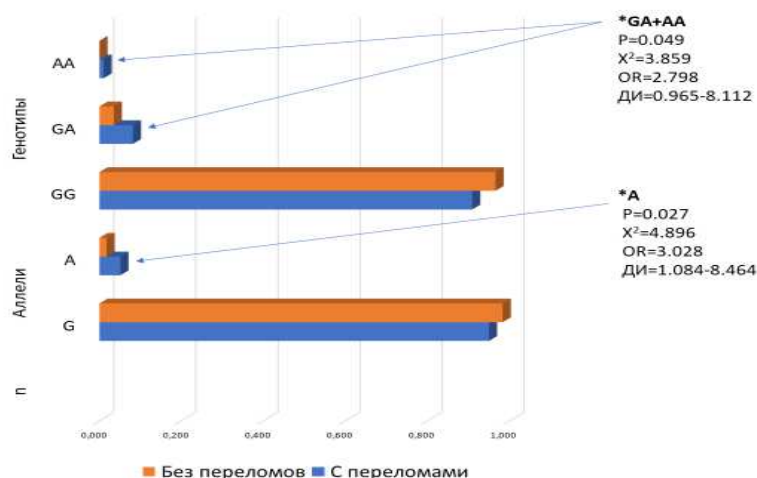


Рис. 4. Распределение частот аллелей и генотипов локуса rs10098470 гена *TPD52* между выборками мужчин с отсутствием/наличием перелома русской этнической принадлежности.

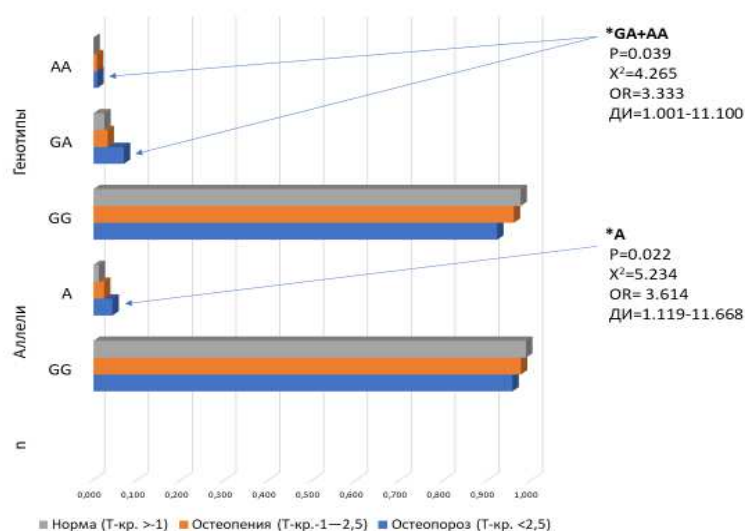


Рис. 5. Распределение частот аллелей и генотипов локуса rs10098470 гена *TPD52* между общими выборками мужчин с остеопорозом/остеопенией/нормой.

Таким образом, проведенное нами исследование является вкладом в познание роли эпигенетических факторов в целом и микроРНК, в частности, первичного остеопороза с учетом полового диморфизма, а также низкого уровня МПКТ и остеопоротических переломов в отдельности.

Литература

1. Bernabei R., Martone A. M., Ortolani E. et al. Screening, diagnosis and treatment of osteoporosis: a brief review // Clinical cases in mineral and bone metabolism. 2014. Vol. 11. No. 3. P. 201–207.
2. Sozen T., Ozisik L., Basaran N. G. An overview and management of osteoporosis // European Journal of Rheumatology. 2017. Vol. 4. No. 1. P. 46–56.
3. Заигрова Н. К., Урьясьев О. М., Шаханов А. В. и др. Возможности инструмента FRAX в диагностике остеопороза // Российский медико-биологический вестник имени И. П. Павлова. 2017. Т. 25. №1. С. 62–68.
4. Karasik D., Rivadeneira F., Johnson M. L. The genetics of bone mass and susceptibility to bone diseases // Nature Reviews Rheumatology. 2016. Vol. 12. No.6. P. 323–34.
5. Olivia L. S., Charles R. F. Using GWAS to identify novel therapeutic targets for osteoporosis // Translational Research. 2017. Vol. 181. P. 15–26.
6. Francesca M., Luisella C., Maria L. B. Epigenetics mechanisms in bone biology and osteoporosis: can they drive therapeutic choices? // International Journal of Molecular Sciences. 2016. Vol. 17. No. 8. P. 1–19.

Analysis of associations of polymorphic variants of sites binding of microRNAs to primary osteoporosis in men and women

B. I. Yalaev*, R. I. Khusainova

Institute of Biochemistry and Genetics UFRC RAS

71 Prospekt Oktyabrya, 450054 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.

**Email: yalaev.bulat@yandex.ru*

The role of polymorphic loci of the binding site of microRNAs in the mRNA of genes that play a significant role in bone metabolism was studied, and association searching was carry out with the risk of osteoporotic fractures and low level of bone mineral density.

Keywords: microRNA, site of binding of microRNA, osteoporosis, bone mineral density, epigenetics, genotyping.