

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА (ТА)6/(ТА)7 В ГЕНЕ *UGT1A1* МЕТОДОМ ПИРОСЕКВЕНИРОВАНИЯ

О.П. Дрибноходова, кандидат биологических наук, К.О. Миронов, кандидат медицинских наук,
Е.А. Дунаева, Г.А. Шипулин, кандидат медицинских наук

Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора,
Россия, 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, 3, а

E-mail: Dribnokhodova@pcr.ru

Введение. Полиморфизм rs8175347 – (ТА)5/6/7/8 – в гене *UGT1A1* влияет на уровень экспрессии уридин-5-дифосфат (УДФ) глюкуронозилтрансферазы (ГТ). Снижение активности фермента у носителей аллелей с 7 и 8 ТА-повторами ассоциировано с повышенным риском развития синдрома Жильбера и нарушением биотрансформации ряда лекарств.

Цель. Разработка методики для определения полиморфизма rs8175347 методом пиросеквенирования.

Материал и методы. Для определения полиморфизма был использован метод пиросеквенирования с использованием системы генетического анализа «PyroMark Q24». Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и пиросеквенирование проводили в соответствии с инструкцией к набору «AmpliSens® Пироскрин». Методика апробирована на 139 образцах.

Результаты. Разработана методика для определения числа ТА-повторов в промоторе гена *UGT1A1* (rs8175347) методом пиросеквенирования. Проведена апробация на клиническом материале. Сформирован алгоритм проведения анализа и определения генотипа. Частота аллеля (ТА)7 в исследованной выборке составила 33,5%.

Заключение. Разработанная методика обеспечивает возможность определения как частых (ТА)6 и (ТА)7, так и редких (ТА)5 и (ТА)8 аллелей исследуемого полиморфизма. Она может быть использована в клинической практике при дифференциальной диагностике гипербилирубинемий, а также при назначении ряда лекарств.

Ключевые слова: *UGT1A1*, синдром Жильбера, иринотекан, пиросеквенирование, SNP

A PYROSEQUENCING-BASED METHOD FOR THE DETECTION OF *UGT1A1* (ТА)6/(ТА)7 POLYMORPHISM

O.P. Dribnokhodova, K.O. Mironov, E.A. Dunaeva, G.A. Shipulin

Central research institute for Epidemiology, Russian Federation, 111123, Moscow, str. Novogireevskaya, 3, a

Introduction. The rs8175347 ((ТА)5/6/7/8) in the *UGT1A1* gene polymorphism is associated with the expression of UDP glucuronosyltransferase 1A1 enzyme. The low enzyme activity in patients with (ТА)7 and (ТА)8 alleles is associated with the risk of Gilbert syndrome and increased drug toxicity.

The aim of the study. The aim of this study was to develop the pyrosequencing-based method for detection of rs8175347.

Methods. A pyrosequencing technique for the «PyroMark Q24» genetic system was used for the detection of the polymorphism. PCR and pyrosequencing was realized in accordance with «AmpliSens Pyroscreen» system. The new method was tested on 139 samples.

Results. A pyrosequencing-based method was developed for the detection of the number of (ТА)-repeats in the *UGT1A1* promoter. The algorithm of analysis and genotype determination was constructed. The (ТА)7 allele frequency in tested samples was 33,5%.

Conclusion. The new method provides the detection of both frequent ((ТА)6 and (ТА)7) and rare ((ТА)5 and (ТА)8) alleles of rs8175347. The method may be used for the differential diagnostics of hyperbilirubinemia and in prescription of drugs.

Key words: *UGT1A1*, Gilbert syndrome, irinotecan, pyrosequencing, SNP

ВВЕДЕНИЕ

Ген *UGT1A1* кодирует изоформу А1 фермента уридин-5-дифосфат (УДФ) глюкуронозилтрансферазы (ГТ), участвующего в процессах биотрансформации билирубина, стероидных гормонов и некоторых лекарственных препаратов. Снижение активности фермента может быть причиной развития патологических состояний и приводить к повышенному риску развития нежелательных лекарственных реакций. В настоящее время известно более 100 аллелей, различающихся как в кодирующей последовательности, так и в промоторном регионе [1].

В большинстве случаев промоторный регион гена *UGT1A1* включает последовательность

А(ТА)6ТАА. При инсерции 1 ТА-повтора в эту последовательность образуется аллель с 7 повторами, что приводит к снижению эффективности транскрипции и уровня экспрессии фермента. Это самый частый аллель с пониженной активностью фермента (*UGT1A1**28, rs8175347 (ТА)7), его частота в разных популяциях значительно варьирует: от 1,5 до 56% у населения разных стран мира и от 26 до 40% – у населения Европы [2]. Описаны также менее распространенные варианты последовательности с 5 и 8 ТА-повторами. Аллель с 5 ТА-повторами ассоциирован с повышенным, а аллель с 8 ТА-повторами – с пониженным уровнем экспрессии фермента [3, 4].

Наличие аллелей с 7 и 8 повторами в гомо- или (реже) в гетерозиготном состоянии ассоциировано с развитием синдрома Жильбера, который является самым частым клиническим вариантом среди наследственных гипербилирубинемий [1, 4]. Распространенность синдрома Жильбера в европейской популяции составляет 2–7% [5]. Снижение активности фермента у носителей аллелей с 7 и 8 (ТА)-повторами может приводить к нежелательным лекарственным реакциям и взаимодействиям, а также к усилению симптоматики синдрома Жильбера при назначении лекарственных препаратов, метаболизируемых с участием УДФ-ГТ (иринотекан, эстрогены, опиоиды) или являющихся ее ингибиторами (эрлотиниб, атазанавир) [1, 6]. Так, у гомозиготных носителей по аллелю (ТА)₇ риск развития тяжелой нейтропении при лечении иринотеканом в 3,5 раз выше, чем при генотипе (ТА)₆/(ТА)₆ [3].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработка методики для определения количества ТА-повторов в промоторе гена UGT1A1 (rs8175347) методом пиросеквенирования.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Определение полиморфизма проводили методом пиросеквенирования с помощью системы генетического анализа «Rugomark Q24» («Qiagen», Германия). Подбор праймеров для проведения пиросеквенирования выполнен с учетом рекомендаций производителя оборудования. При разработке методики использовались реагенты для амплификации производства ФБУН Центрального НИИ эпидемиологии (Москва) и реагенты для пиросеквенирования «Qiagen» (Германия) [7].

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и пиросеквенирование проводили по инструкции к набору «АмплиСенс® Пироскрин» (ФБУН Центрального НИИ эпидемиологии). Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала праймеры для амплификации (по 0,28 мкМ) и dNTP (0,88 мМ), 0,5 мкл реактива «Полимераза TaqF», 10 мкл реактива «2,5× ПЦР-буфера blue» и 10 мкл ДНК-пробы. Для пиросеквенирования использовалось 5 мкл ПЦР-продукта и секвенирующий праймер (0,3 мМ).

После оптимизации условий ПЦР и пиросеквенирования была проведена апробация методики на 139 образцах ДНК, выделенных из крови.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения аллелей полиморфизма rs8175347 в гене UGT1A1 была разработана методика амплификации участка ДНК, включающего фрагмент промоторной части гена UGT1A1, и определения методом пиросеквенирования нуклеотидной последовательности в области, соответствующей полиморфизму rs8175347. Для проведения ПЦР были подобраны следующие праймеры: «UA1-F2» (5'-GCT-ACC-TTT-GTG-GAC-TGA-CAG-CTT-3') и «UA1-R2» (5'-CTT-TGC-TCC-TGC-CAG-AGG-TT-3'), для проведения реакции пиросеквенирования был использован секвенирующий праймер «UA1-S6» (5'-TCG-CCC-TCT-CCT-ACT-TAT-ATA-TAT-3'), длина фрагмента 129 п.о.

На основе анализа нуклеотидных последовательностей, соответствующих известным аллелям (ТА)₅/₆/₇/₈, и результатов секвенирования клинических образцов был сформулирован алгоритм проведения исследования и определения генотипа. Для детекции наиболее частого варианта полиморфизма (ТА)₆/₇ (6 или 7 ТА-повторов) использовался следующий порядок подачи нуклеотидов в реакцию смесь (Dispensation Order): CATATCATATGCAA. При анализе полученных результатов использовалась последовательность (Sequence to Analyze) ATATAT[AT]

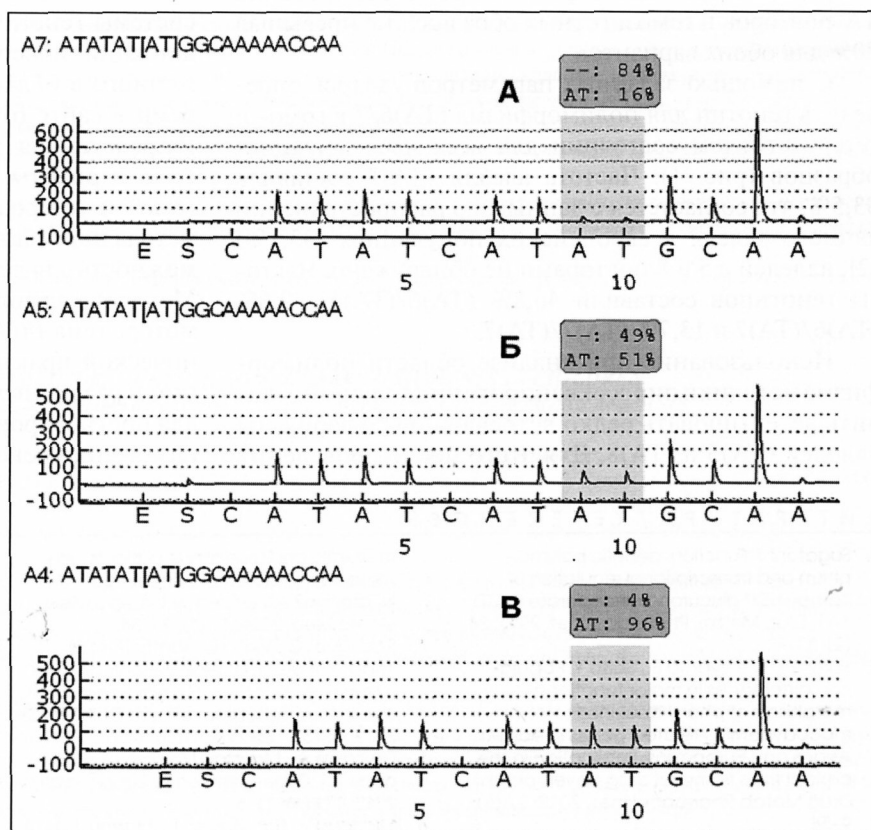


Рис. 1. Пример детекции полиморфизма rs8175347 в гомо- и гетерозиготном состоянии: А – генотип (ТА)₆/(ТА)₆, Б – генотип (ТА)₆/(ТА)₇, С – генотип (ТА)₇/(ТА)₇.

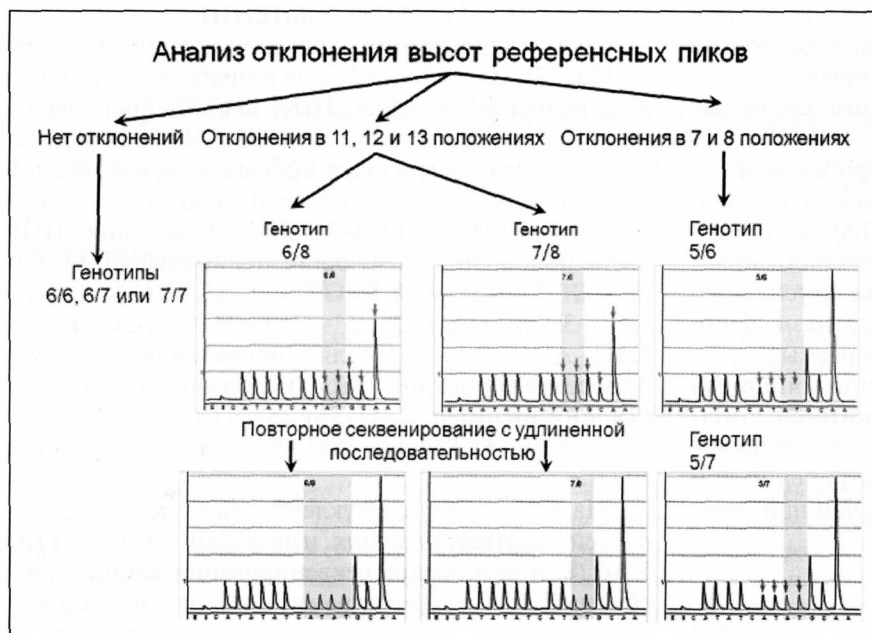


Рис. 2. Схема проведения анализа. Стрелками на схемах указаны пики, по высоте которых проводится идентификация генотипа в случае обнаружения редких вариантов полиморфизма – аллели (TA)₅ и (TA)₈.

GGCAAAAACCAA. Уровень фонового значения сигнала, соответствующего альтернативному аллелю, полученный при анализе результатов секвенирования TA-повторов в гомозиготных образцах, не превышал 20% для обоих вариантов.

С помощью заданных параметров удалось определить генотип для полиморфизма (TA)₆/7 в гомо- и гетерозиготном состоянии для всех исследованных образцов (рис. 1). Частота аллеля (TA)₇ составила 33,5%, что согласуется с данными о распространении данного аллеля в европейских популяциях (33,1%) [2], аллелей с 5 и 8 повторами не обнаружено. Частоты генотипов составили 46,8% (TA)₆/(TA)₆, 39,6% (TA)₆/(TA)₇ и 13,7% (TA)₇/(TA)₇.

Использование при анализе области полиморфизма методики пиросеквенирования должно позволить детектировать редко встречающиеся варианты аллелей (TA)₅ и (TA)₈. Для этого после проведения

реакции следует сравнить полученную пираграмму со схемами ожидаемых результатов для генотипов с 6 и 7 TA-повторами (рис. 2). В случае отклонения высот референсных пиков в 7-м и 8-м положениях секвенируемой нуклеотидной последовательности необходимо проверить образец на присутствие аллеля (TA)₅, сравнив со схемами ожидаемых результатов для соответствующих генотипов. В случае отклонения высот референсных пиков в 11, 12 и 13-м положениях нуклеотидной последовательности необходимо проверить образец на присутствие варианта (TA)₈ и провести дополнительный анализ с измененным порядком подачи нуклеотидов в реакционную смесь (добавление дополнительной пары нуклеотидов TA) и, соответственно, удлиненной последовательностью для анализа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показана возможность успешного применения системы генетического анализа «РугоMark Q24» для детекции инсерционного полиморфизма, расположенного в области с низким GC-составом и повторами в сайте отжига праймера для секвенирования. Разработанная методика позволяет определять частые варианты генотипа полиморфизма (TA)₆/7 в гомо- и гетерозиготном состоянии. Использование метода пиросеквенирования также обеспечивает возможность для детекции редких аллелей (TA)₅ и (TA)₈. Методика для определения числа TA-повторов в промоторе гена *UGT1A1* может быть использована в клинической практике для дифференциальной диагностики различных форм гипербилирубинемий, а также для прогнозирования эффективности и безопасности назначения некоторых лекарственных препаратов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Sugatani J. Function, genetic polymorphism and transcriptional regulation of human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A1. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2013; 28 (2): 83–92.
- Kurose K., Sugiyama E., Saito Y. Population differences in major functional polymorphisms of pharmacokinetics/pharmacodynamics-related genes in eastern Asians and Europeans: implication in the clinical trials for novel drug development. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2012; 27 (1): 9–54.
- Palomaki G.E., Bradley L.A., Douglas M.P. et al. Can UGT1A1 genotyping reduce morbidity and mortality in patients with metastatic colorectal cancer treated with irinotecan? An evidence-based review. *Genet Med.* 2009; 11 (1): 21–34.
- Rodrigues C., Vieira E., Santos R. et al. Impact of UGT1A1 gene variants on total bilirubin levels in Gilbert syndrome patients and in healthy subjects. *Blood Cells Mol Dis.* 2012; 48 (3): 166–72.
- Fretzayas A., Moustaki M., Liapi O., Karpathios T. Gilbert syndrome. *Eur J Pediatr.* 2012; 171 (1): 11–5.
- Michaud V., Bar-Magen T., Turgeon J. et al. The dual role of pharmacogenetics in HIV treatment: mutations and polymorphisms regulating antiretroviral drug resistance and disposition. *Pharmacol Rev.* 2012; 64 (3): 803–33.
- Мионов К.О., Дунаева Е.А., Дрибноходова О.П., Шипулин Г.А. Детекция генетических полиморфизмов с помощью систем генетического анализа на основе пиросеквенирования. *Современные медицинские технологии.* 2011; 6: 39–41. (Mironov K.O., Dunaeva E.A., Dribnokhodova O.P., Shipulin G.A. The detection of genetic polymorphisms by pyrosequencing technique. *Sovremennye medicinskie tehnologii.* 2011; 6: 39–41 (in Russian))