

УДК 575.117.2.174.015.3:612.014.69

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНА C-FOS И ЕГО ЭКСПРЕССИВНАЯ АКТИВНОСТЬ В НОРМЕ И ПРИ ЭНДОТОКСИКОЗЕ**Трофимов В.А., Лопухова Е.Н., Власов А.П.***ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва»,
Саранск, e-mail: geneticLab@yandex.ru*

Изучены некоторые механизмы участия гена *c-fos* и кодируемого им белкового продукта в развитии эндотоксикоза как осложнения при хирургических заболеваниях. Не получено достоверных доказательств ассоциации полиморфизмов *rs2239615* и *rs7101*, обусловленных однонуклеотидными заменами в 5'-лидерной области гена *c-fos*, с хронизацией воспалительного процесса и формированием эндотоксикоза как крайней формы заболевания. В то же время показано, что при эндотоксикозе в клетках крови больных в зависимости от тяжести заболевания отмечается повышенный уровень экспрессии гена *c-fos* по сравнению с нормой, определяемый по накоплению кДНК гена методом обратной транскрипции. Предполагается, что участие гена *c-fos* в формировании эндотоксикоза как системного заболевания связано с изменением его экспрессивности и изменением активности контролируемых им генов, влияющих на жизнеспособность и функциональную активность клеток.

Ключевые слова: ген *c-fos*, однонуклеотидный полиморфизм, генная экспрессия, эндотоксикоз**PREVALENCE OF GENE POLYMORPHISM C-FOS AND ITS EXPRESSIVE ACTIVITY IN THE NORMAL CONDITIONS AND IN ENDOTOXICOSIS****Trofimov V.A., Lopukhova E.N., Vlasov A.P.***Ogarev Mordovia State University, Saransk, e-mail: geneticLab@yandex.ru*

Some mechanisms of participation for the *c-fos* gene and protein product encoded by it in the development of endotoxycosis as complications of surgical diseases were examined. There was no association revealed between the presence of polymorphisms *rs2239615* and *rs7101* caused by the single-nucleotide substitutions in the 5'-leader region of the *c-fos* gene, and with the chronization of inflammatory process and formation of endotoxycosis as an extreme form of the disease. At the same time, it was shown that with endotoxycosis depending on the weight of the disease patients have a more elevated level of gene expression as compared with the norm, being determined by the accumulation of the gene cDNA by means of the method of reverse transcription. It is assumed that the participation of *c-fos* gene in the formation of endotoxycosis as a systemic disease is associated with the change of its expression and with the change of the activity of genes controlled by *c-fos*, affecting the viability and functional activity of the cells.

Keywords: *c-fos*, single-nucleotide polymorphism, gene expression, endotoxycosis

Гены раннего ответа (ГРО) привлекают пристальное внимание исследователей в силу ряда причин. При действии на клетки различных стимулов они включаются первыми и запускают сложные генные сети, формирующие физиологические реакции клетки. Важной особенностью ГРО является консервативность, которая является отражением их ключевой роли в клеточной регуляции. Существенные нарушения, приводящие к деактивации или гиперэкспрессии этих генов, могут быть причиной различных заболеваний, в частности онкологических, связанных с системными нарушениями на организменном уровне [8].

Ярким представителем генов раннего ответа является ген *c-fos*, который вместе с белком *c-Jun*, образует транскрипционный фактор AP-1, играющий важную роль в клеточной регуляции [5]. Показано, что изменение экспрессивной активности *c-fos* может быть связано с атеросклерозом, воспалением дыхательных путей, ишемической болезнью сердца [3, 10–12].

Для понимания механизмов модификации генной экспрессии активно исследуются полиморфные варианты гена *c-fos*, их влияние на работу гена и активность кодируемого белка. В базе данных ENSEMBL представлено 6 вариантов SNP, из них по пяти генам проведено исследование в рамках 1000 Genomes [7]. Выявлены три наиболее распространённые однонуклеотидные замены: *rs1046117*, *rs2239615* и *rs7101*. В настоящее время проводится анализ их распространённости при различных заболеваниях [9].

В настоящей работе представлены результаты исследования распространённости полиморфизмов *rs2239615*, *rs7101* в группах доноров и больных с эндотоксикозом, а также экспрессивной активности гена *c-fos* с целью выявления механизмов, лежащих в основе хронизации воспалительных заболеваний и развития эндотоксикоза.

Материалы и методы исследования

Работу проводили на образцах ДНК и РНК, выделенных из цельной венозной крови доноров

и больных с острым аппендицитом, осложненным перитонитом, у которых зарегистрированы явления эндогенной интоксикации различной степени тяжести. Параметрами формирования выборок и оценки эндотоксикоза являлись общепринятые лабораторно-клинические и биохимические показатели [1].

Выделение ДНК проводили по методу L.-L. Woodram (2004) с модификациями [4]. Анализ полиморфизмов проводили методом PCR-SSCP. Амплификацию проводили согласно следующим параметрам: для полиморфизма *rs2239615*: 95°C – 180 с, 30 циклов 60°C – 10 сек, 95°C – 10 с (длина продукта 95 п.н.); для полиморфизма *rs7101*: 95°C – 180 с, 30 циклов 63°C – 50 с, 95°C – 20 с (длина продукта 258 п.н.) с использованием специфических праймеров (*rs2239615* F.: 5'-GGC GCC TCG TAC TCC AAC C-3', R.: 5'-GAG CAC GGT CAC TGC TCG TT-3' [6]; *rs7101* F.: 5'-CGA GCA GTG ACC GTG CTC CT-3', R.: 5'-GAG TGG TAG TAA GAG AGG CTA T-3' [14]) («Синтол», Россия).

Для анализа экспрессивной активности использовали метод ОТ-ПЦР. РНК выделяли с помощью набора РНК-Экстран («Синтол», Россия). кДНК была синтезирована из тотальной РНК с использованием праймера Олиго(dT) и MMLV-RT («Синтол», Россия). Амплификацию проводили согласно следующим параметрам: 40 циклов 95°C – 15 с, 60°C – 40 с, 72°C –

40 с с использованием специфических праймеров на кДНК *c-fos*: F 5'-GGA GGA CCT TAT CTG TGC GTG A-3', R 5'-GAA CAC ACT ATT GCC AGG AAC ACA-3 [12]. Внутренний контроль проводили с использованием ПЦР реакции на ген *AKTB*, набором фирмы «Синтол».

Ампликоны, синтезированные для анализа SNP, денатурировали в формамиде в течение 6 мин при 96°C, резко охлаждали на льду для получения однонитевых фрагментов и разделяли в 10% полиакриламидном геле, содержащем 0,5×ТБЕ, в присутствии глицерола, при температуре 25°C. Электрофорез проводили при постоянном напряжении 150 В в течение 8,5 часов для *rs7101* и 11 часов для *rs2239615*. Окраска геля проводилась с помощью бромистого этидия и азотнокислого серебра.

Полученные данные статистически обрабатывали методом вариационной статистики с использованием *t*-критерия Стьюдента. Популяционно-генетический анализ проводили стандартными методами [2, 13].

Результаты исследования и их обсуждение

Проведенное нами исследование SNP показало наличие всех вариантов генотипов в выборках доноров и больных с эндотоксикозом (таблица).

Частота встречаемости аллелей и генотипов по изучаемым полиморфизмам

Выборка	Ген/полиморфизм	Частота генотипов, %			Частота аллелей		χ^2	OR аллель (95%)
		3	4	5	6	7		
Доноры (n = 51)	<i>rs2239615</i> + 71Т/А	АА	АТ	ТТ	А	Т	0,191	0,74 (0,29–1,75)
Больные с эндотоксикозом (n = 41)		45,10 (n = 23)	35,29 (n = 18)	19,61 (n = 10)	0,63	0,37		
Доноры (n = 51)	<i>rs7101</i> + 146 С/Т	ТТ	ТС	СС	Т	С	0,022	2,19 (0,82–6,21)
Больные с эндотоксикозом (n = 41)		70,59 (n = 36)	25,49 (n = 13)	3,92 (n = 2)	0,83	0,17		
		43,90 (n = 18)	51,22 (n = 21)	4,88 (n = 2)	0,70	0,30	0,111	

Известно, что полиморфизм *rs2239615* (14:g.75745551Т > А, с.-135Т > А, п.21Т > А) обусловлен заменой Т/А в 5'-лидерной области 71 нуклеотида от начала единицы транскрипции. Частоты генотипов и аллелей полиморфизма у доноров и больных с эндотоксикозом представлены в таблице. Ассоциации аллеля Т с предрасположенностью к развитию эндотоксикоза нами не выявлено.

Полученные данные соответствуют результатам исследования 1000 Genomes, в котором было показано, что частоты аллелей полиморфизма *rs2239615* в целом по миру составили А – 72%, Т – 28%, в ев-

ропейской популяции – 75 и 25% соответственно.

Полиморфизм *rs7101* гена *c-fos* обусловлен заменой С/Т в 5'-лидерной области 146 нуклеотида от начала единицы транскрипции (14:g.75745626С > Т, с.-60С > Т, п.96С > Т). В исследуемой группе доноров частоты данных аллелей составили Т – 83% и С – 17%, в группе больных с эндотоксикозом – 70 и 30% соответственно (таблица). Выявлена ассоциация аллеля С с предрасположенностью к развитию эндотоксикоза (OR > 1). Однако в целом частоты встречаемости данного аллеля в группе больных с эндотоксикозом соответствуют данным,

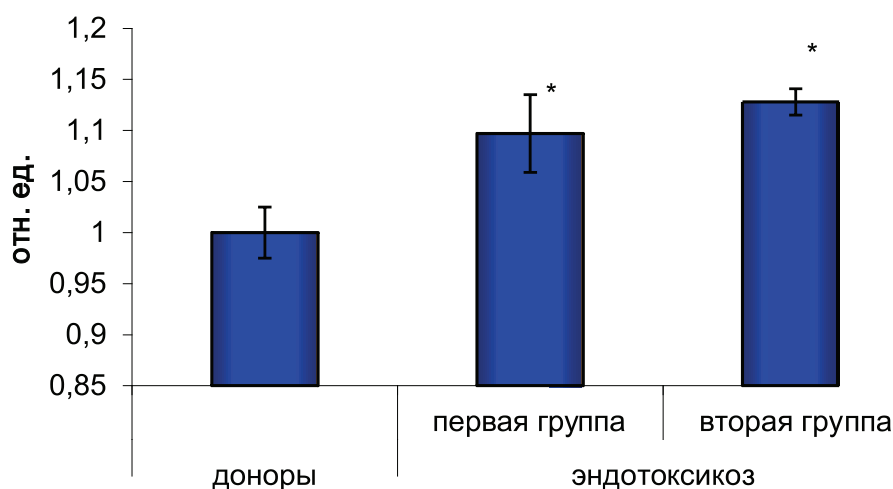
полученным в исследовании 1000 Genomes. Выявленные нами различия в частотах аллелей могут отражать наличие популяционных особенностей, а также различий в критериях формирования выборок обследуемых.

Таким образом, полученные нами данные не позволяют с абсолютной уверенностью говорить о вкладе полиморфных вариантов гена *c-fos* в формирование и развитие эндотоксикоза.

Для поиска механизма участия гена *c-fos* в возникновении эндотоксикоза нами исследована его экспрессивная активность

в норме и при эндотоксикозе. Для реализации данной цели нами был проведен анализ уровня мРНК гена *c-fos* относительно содержания мРНК гена β -актина (*АКТВ*) по накоплению кДНК фрагментов. В норме ген *c-fos* экспрессируется в малых и недектируемых количествах, при этом он способен быстро активироваться в ответ на внешние воздействия [8].

В целом анализ крови доноров и больных показал относительное увеличение в эксперименте накопления кДНК гена *c-fos* в клетках в зависимости от тяжести эндотоксикоза (рисунок).



Возрастание относительного содержания кДНК гена *c-fos* при эндотоксикозе.

Примечание: * – достоверность отличия по отношению к уровню в группе доноров при $p < 0,01$

Так, в группе больных с легкой формой эндотоксикоза (1 группа) содержание кДНК увеличилось в среднем на 9% относительно контроля и составило $1,097 \pm 0,038$. При увеличении выраженности эндотоксикоза содержание кДНК возрастало и составляло в среднем $1,128 \pm 0,013$.

Таким образом, при эндотоксикозе отмечается повышенный уровень экспрессии гена *c-fos* в клетках крови, что может рассматриваться в качестве одного из механизмов систематизации воспалительного процесса и его хронизации с развитием эндотоксикоза.

Заключение

Эндотоксикоз как следствие воспаления характеризуется глубокими и стабильными нарушениями метаболизма, накоплением продуктов патологического обмена, обладающих токсическим действием и развитием дизрегуляторных процессов в организме. Изучение молекулярных механизмов формирования и развития эндотоксикоза является актуальной задачей биомедицины.

В настоящей работе изучены частоты генотипов и аллелей полиморфизмов гена *c-fos* у доноров и больных с эндотоксикозом. Нами не выявлено ассоциации полиморфизмов *rs7101* и *rs2239615* с эндотоксикозом. В то же время показано, что при эндотоксикозе в клетках крови больных отмечается повышенный уровень экспрессивной активности гена по сравнению со здоровыми людьми.

По-видимому, участие гена *c-fos* в формировании эндотоксикоза как системного заболевания может быть связано с изменением его экспрессируемости, вследствие глубоких биохимических и метаболических изменений в организме, приводящих к нарушению спектра биомолекул, влияющих на работу гена раннего ответа. Изменение экспрессируемости гена *c-fos* может приводить к изменению уровня экспрессивной активности контролируемых им генов (*ngf*, *DNMT1*, *NF-κB* и других) и изменению активности клеточных процессов, включая регуляцию (или дезрегуляцию) липидного

метаболизма, противовоспалительных реакций организма, пролиферативной активности клеток и даже апоптоза, в конечном итоге влияющих на жизнеспособность и функциональную активность клеток.

Список литературы

1. Карпищенко А.И. Медицинские лабораторные технологии и диагностика: в 2 т. Т.2 / А.И. Карпищенко и др. – СПб.: Интермедика. – 1999. – 656 с.
2. Ли Ч. Введение в популяционную генетику: пер. с англ. Е.А. Салменкова, Е.Я. Тетушкина; под ред. Ю.П. Алтухова, Л.А. Жиговецкого. – М.: Мир, 1978. – 555 с.
3. Трофимов В.А. Влияние холестерина на экспрессию генов раннего ответа и метогическую активность перитонеальных макрофагов / В.А. Трофимов, О.Н. Аксенова, А.В. Никулин, М.В. Ромашкина, Е.А. Иванова, А.М. Орешин // Казанский медицинский журнал. – 2009. – Т. 90, № 4. – С. 160–163.
4. Boodram L.-L. Extraction of genomic DNA from whole blood / Protocol Online – Your Lab’s Reference Book – online database of research protocols in a variety of life science fields [Electronic resource]. – Mode of access: <http://www.protocol-online.org/prot/Protocols/Extraction-of-genomic-DNA-from-whole-blood-3171.html> (date of access: 10.09.2012).
5. Chinenov Y. Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity / Y. Chinenov, and T.K. Kerppola // *Oncogene*. – 2001. – Vol. 20, No. 19. – P. 2438–2452.
6. dbQSNP Public – Kyushu university genome database [Electronic resource]. – Mode of access: http://qsnp.gen.kyushu-u.ac.jp/STS_info.cgi?stsnum=KG00G2243 (date of access: 15.02.2013).
7. Ensembl – is a joint online project between EMBL – EBI and the Wellcome Trust Sanger Institute [Electronic resource]. – URL: <http://www.ensembl.org/index.html> (date of access: 15.02.2013).
8. Healy S. Immediate early response genes and cell transformation / S. Healy, P. Khan, J.R. Davie // *Pharmacology & Therapeutics* – 2013. – Vol. 137. – P. 64–77.
9. Knebel B. A mutation in the c-Fos gene associated with congenital generalized lipodystrophy / B. Knebel, J. Kotzka, S. Lehr, et al. // *Orphanet Journal of Rare Diseases*. – 2013. – Vol. 8. – P. 119.
10. McKay S. Pro-inflammatory cytokines induce c-fos expression followed by IL-6 release in human airway smooth muscle cells / S. McKay, M.M.G. Bromhaar, J.C. de Jongste, et al. // *Mediators of Inflammation* – 2001 – Vol. 10. – P. 135–142.
11. Patino W.D. Circulating transcriptome reveals markers of atherosclerosis / W.D. Patino, O.Y. Mian, Ju-G. Kang, et al. // *PNAS* – 2005. – Vol. 102, № 9. – P. 3423–3428.
12. Saliques S. Smoking and FOS expression from blood leukocyte transcripts in patients with coronary artery disease / S. Saliques, J.-R. Teyssier, C. Vergely et al. // *Atherosclerosis* – 2011. – Vol. 219. – P. 931–936.
13. Schlesselman J.J. Case-Control Studies: Design, Conduct, Analysis: Design, Conduct, Analysis (Monographs in epidemiology and biostatistics) / J.J. Schlesselman – New York. : Oxford University Press. – 1982. – 368 p.

14. Yiu W.C. Genetic susceptibility to refractive error: association of vasoactive intestinal peptide receptor 2 (VIPR2) with high myopia in Chinese / W.C. Yiu, M.H. Yap W.Y. Fung, et al. // *PLoS One* – 2013. – Vol. 8(4) – e61805.

References

1. Karpischenko A.I. Meditsinskie laboratornyye tehnologii i diagnostika [Medical laboratory technology and diagnostics] SPb, Intermedika., 1999. 656 p.
2. Li Ch. Vvedenie v populyatsionnyuyu genetiku [First course in population genetics] Moskow, Mir Publ., 1978. 555 p.
3. Trofimov V.A., Aksenova O.N., Nikulin A.V., Romashkina M.V., Ivanova E.A., Oreshin A.M. *Kazanskiy meditsinskiy jurnal*, 2009, T. 90, no. 4, pp. 160–163.
4. Boodram L.-L. Extraction of genomic DNA from whole blood. Available at: <http://www.protocol-online.org/prot/Protocols/Extraction-of-genomic-DNA-from-whole-blood-3171.html> (accessed 10 September 2012).
5. Chinenov Y., Kerppola T.K. *Oncogene*, 2001, Vol. 20, no. 19, pp. 2438–2452.
6. dbQSNP Public – Kyushu university genome database. Available at: http://qsnp.gen.kyushu-u.ac.jp/STS_info.cgi?stsnum=KG00G2243 (accessed 15 February 2013).
7. Ensembl – is a joint online project between EMBL – EBI and the Wellcome Trust Sanger Institute. Available at: <http://www.ensembl.org/index.html> (accessed 15 February 2013).
8. Healy S., Khan P., Davie J.R. *Pharmacology & Therapeutics*, 2013, Vol. 137, pp. 64–77.
9. Knebel B., Kotzka J., Lehr S., Hartwig S., Avci H., Jacob S., Nitzgen U., Schiller M., März W., Hoffmann M.M., Seemanova E., Haas J., Muller-Wieland D. *Orphanet J Rare Dis.*, 2013, Vol. 8: 119.
10. McKay S., Bromhaar M.M., de Jongste J.C., Hoogsteden H.C., Saxena P.R., Sharma H.S. *Mediators Inflamm.*, 2001, Vol. 10, pp. 135–142.
11. Patino W.D., Mian O.Y., Kang J.G., Matoba S., Bartlett L.D., Holbrook B., Trout H.H. 3rd, Kozloff L., Hwang P.M. *PNAS*, 2005, Vol. 102, no. 9, pp. 3423–3428.
12. Saliques S., Teyssier J.R., Vergely C., Lorgis L., Lorin J., Donzel A., Sicard P., Berchoud J., Ragot S., Touzery C., Cottin Y., Rochette L., Zeller M. *Atherosclerosis*, 2011, Vol. 219, pp. 931–936.
13. Schlesselman J.J. Case-Control Studies : Design, Conduct, Analysis: Design, Conduct, Analysis (Monographs in epidemiology and biostatistics) New York. Oxford University Press., 1982, 368 p.
14. Yiu W.C., Yap M.K., Fung W.Y., Ng P.W., Yip S.P. *PLoS One*, 2013, Vol. 8(4), e61805.

Рецензенты:

Ледяйкина Л.В., д.м.н., доцент, ГБУЗ РМ «Мордовский республиканский клинический перинатальный центр», г. Саранск;
Шубина О.С., д.б.н., профессор, зав. кафедрой биологии, географии и методик обучения, ФГБОУ ВПО «МГПИ им. М.Е. Евсевьева», г. Саранск.

Работа поступила в редакцию 16.12.2014.