

УДК 577.21, 575.224.22, 616.711-002

## Ассоциация аллельного варианта гена аминопептидазы ERAP1 с риском развития анкилозирующего спондилита

И. В. Звягин<sup>1\*#</sup>, В. Ю. Дородных<sup>1#</sup>, И. З. Мамедов<sup>1</sup>, Д. Б. Староверов<sup>1</sup>, А. Г. Бочкова<sup>2</sup>,  
Д. В. Ребриков<sup>3,4</sup>, Ю. Б. Лебедев<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

<sup>2</sup> Институт ревматологии РАМН, Москва

<sup>3</sup> Учреждение Российской академии наук Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва

<sup>4</sup> ООО «ДНК-Технология», Москва

# Авторы внесли равный вклад в данную работу.

\*E-mail: izvyagin@gmail.com

Поступила в редакцию 03.09.2010 г.

**РЕФЕРАТ** Анкилозирующий спондилит – аутоиммунное заболевание, в развитие которого вовлечен целый ряд генов, продукты которых выполняют различные функции в системе иммунитета. С повышенным риском развития анкилозирующего спондилита ассоциирован ряд несинонимичных однонуклеотидных полиморфизмов в кодирующей части гена аминопептидазы ERAP1. Мы провели анализ представленности аллельных вариантов гена *erap1* по пяти несинонимичным однонуклеотидным полиморфизмам, связанным с риском развития заболевания среди представителей европеоидной расы. С помощью аллель-специфической ПЦР определены генотипы 84 больных и 77 здоровых доноров из российской популяции, положительных по аллельному варианту *hla-B\*27*. Мы установили статистически достоверные отличия представленности аллельных вариантов по трем из пяти маркеров среди больных по сравнению с контрольной группой. По результатам генотипирования восстановлены теоретические гаплотипы по трем маркерам гена *erap1* и найдены два гаплотипа, представленность которых достоверно различается между выборками. Один из этих гаплотипов определен как предположительно рискованный, второй – как предположительно протективный. С использованием образцов кДНК и аллель-специфических пар праймеров восстановлены фактические гаплотипы в выборке больных. Показано соответствие теоретически рассчитанных частот гаплотипов и определенных экспериментально. Частота рискованного гаплотипа ССТ (rs17482078/10050860/2287987) в группе больных составила 88%, что полностью соответствовало результатам EM-реконструкции.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** аминопептидаза ERAP1, однонуклеотидный полиморфизм, аллель-специфическая ПЦР, гаплотип, анкилозирующий спондилит.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** АС – анкилозирующий спондилит; ЭПР – эндоплазматический ретикулум; МНС – главный комплекс гистосовместимости; ФНО, РФНО – фактор некроза опухоли, рецептор фактора некроза опухоли; ИЛ – интерлейкин.

### ВВЕДЕНИЕ

Анкилозирующий спондилит (АС) – аутоиммунное заболевание, относящееся к группе спондилоартропатий, для которого характерно развитие воспаления суставов осевого скелета с последующим формированием участков окостенения. Признаки заболевания появляются в основном в возрасте 20–25 лет и медленно прогрессируют в течение всей жизни. К настоящему времени выявлен ряд ассоциаций риска развития заболевания с несколькими геномными ло-

кусами, продукты которых действуют на разных стадиях иммунного ответа. По результатам близнецовых исследований у монозиготных близнецов конкордантность варьирует от 26 до 60%, в то время как у дизиготных – от 4 до 20%, что демонстрирует важность генетического окружения для развития АС [1–3].

Наиболее строгая ассоциация с развитием заболевания выявлена для аллельного варианта *hla-B\*27* гена МНС типа I. Среди больных АС представителей европеоидной расы около 90% – носители дан-

ного аллеля, однако заболевание развивается только у 5% носителей *hla-B\*27* [4]. В результате крупномасштабных полногеномных исследований, проведенных на больших выборках больных и здоровых доноров, обнаружены ассоциации однонуклеотидных замен в нескольких геномных локусах, не относящихся к МНС-I. Для этих локусов характерна менее строгая ассоциация с риском развития АС. Среди неМНС-локусов наиболее сильная ассоциация показана для гена аминоксептидазы *erap1* [5, 6].

Аминоксептидаза ERAP1 принимает участие в ряде процессов в ходе иммунного ответа. Различия в функциональной роли белка связаны, вероятно, с тем или иным месторасположением ERAP1. Так, основным местом локализации ERAP1 в клетках человека и мыши признан эндоплазматический ретикулум (ЭПР), вместе с тем, в ряде клеток человека существуют формы белка, связанные с внешней поверхностью цитоплазматической мембраны либо секреторируемые в межклеточное пространство [7]. Одной из функций ERAP1 является N-концевой протеолиз пептидов, образующихся в ходе деградации клеточных белков с участием протеасомы, для презентации их в контексте молекул МНС-I. Кроме того, ERAP1 связана с образованием растворимой формы рецептора типа 1 фактора некроза опухоли (РФНО-1) и растворимых форм рецепторов интерлейкинов (ИЛ) 1 и 6, играя важную роль в регуляции иммунного ответа [8–10].

Проведенные к настоящему времени исследования на выборках различной этнической принадлежности и степени генетической однородности по *hla-b*-локусу выявили в кодирующей части гена *erap1* ряд несинонимичных однонуклеотидных полиморфизмов, ассоциированных с повышенным риском развития АС [11–15]. При этом набор ассоциированных с АС полиморфизмов в этих работах различается, что, вероятно, связано с генетическими особенностями исследованных выборок.

Наличие аминоксептидных замен и их сочетаний, обусловленных несинонимичными заменами, возможно, приводит к образованию вариантов аминоксептидазы с различной активностью, а также к нарушению процессинга презентуемых пептидов или регуляции активности клеток иммунной системы посредством ФНО или ИЛ-1 и -6. Предполагаемая роль ERAP1 в развитии АС может заключаться в презентации молекулами МНС-I неправильных пептидов вследствие нарушения функций протеиназы, что может приводить к распознаванию представленных пептидов как чужеродных, а также к повышению уровня свободных молекул МНС-I или гомодимеров, состоящих только из тяжелых цепей на поверхности клетки. В результате возможно развитие неспецифических иммунных реакций против клеток, продуцирующих

неправильно свернутые белки [16]. Нарушение активности аминоксептидазы в отношении рецепторов к ИЛ также может объяснять вклад мутантных вариантов ERAP1 в развитие АС.

В нашей работе мы определили частоты встречаемости аллельных вариантов гена *erap1* и соответствующих генотипов по пяти молекулярно-генетическим маркерам, представляющим собой однонуклеотидные несинонимичные замены в кодирующей части гена у больных АС и у здоровых доноров из российской популяции. Все больные и все члены контрольной группы были положительными по аллелю *hla-B\*27*. Для генотипирования были выбраны маркеры rs2287987 (Met349Val), rs30187 (Lys528Arg), rs10050860 (Asp575Asn), rs17482078 (Arg725Gln) и rs27044 (Glu730Gln), ассоциированные с АС по данным разных авторов [11–15]. Расположение указанных несинонимичных замен в кодирующей части гена *erap1* позволяет предполагать функциональную значимость соответствующих аминоксептидных замен.

Результаты определения генотипов были использованы для построения расчетных гаплотипов по указанным маркерам и последующего анализа ассоциации аллельных вариантов *erap1* с риском развития АС.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Образцы геномной ДНК и РНК

В работе использованы образцы геномной ДНК, полученные из периферической крови 77 *hla-B\*27*-положительных здоровых доноров в возрасте от 21 до 63 лет и 84 *hla-B\*27*-положительных больных с аксиальной формой АС. Геномную ДНК выделяли из лейкоцитарной фракции крови с помощью набора реактивов Diatom Prep 100 (Лаборатория Изоген, Москва) в соответствии с инструкцией производителя.

Образцы суммарной РНК больных выделяли из лейкоцитарной фракции периферической крови с помощью реактива «TRIzol» (Invitrogen Lifetechnologies, США) в соответствии со стандартным протоколом производителя.

### Синтез первых цепей кДНК

Синтез первых цепей кДНК проводили, используя 1–2 мкг суммарной РНК с помощью набора для синтеза первых цепей кДНК «Mint» (Евроген, Россия), в соответствии с протоколом производителя.

### Определение гено- и гаплотипов

Генотипирование проводили методом аллель-специфической ПЦР с использованием сочетания пар праймеров, соответствующего определяемому молекулярно-генетическому маркеру (табл. 1):

Таблица 1. Структура праймеров, использованных в работе

Праймер	Нуклеотидная последовательность (5'–3')
30-A For	ATGAACACTTGGACACTGCACAA
30-G For	ATGAACACTTGGACACTGCACAG
27-C Rev	CACACAGGCGAGGAGTAGTAGATC
27-G Rev	CACACAGGCGAGGAGTAGTAGATG
100-G For	CATTCATCACCAGCAAATGCG
100-A For	CATTCATCACCAGCAAATGCA
174-T Rev	TAGTAGTTSACTCCGCAGCAATT
174-C Rev	TAGTAGTTSACTCCGCAGCAATC
228-A For	ATCAAGTAAGCTTGGCATCAGAA
228-G For	ATCAAGTAAGCTTGGCATCAGAG
228 int	AACAAATTAACCTCAAATGTGAAG
30 int	CCTCCTTAATCCTACTGGGAAGAT
100 int	GGCCATACATATGATATAACCCAGTA
174&27 int	CTGGGACTCTTCATGGTACTTGAG

аллель-специфический праймер к определяемому маркеру совместно с праймером, специфичным к ближайшему интрону. Генотип определяли по наличию или отсутствию продукта ПЦР соответствующей длины. Для определения гаплотипов использовали аллель-специфическую ПЦР с кДНК в качестве матрицы, прямой и обратный аллель-специфические праймеры к соответствующей паре маркеров.

Для повышения дискриминирующей способности в каждый из аллель-специфических праймеров был введен некомплементарный матрице нуклеотид в положение -3. Достоверность результатов подтверждали независимым повторением гено- и гаплотипирования, а также непротиворечивостью результатов определения гено- и гаплотипов.

Реакцию ПЦР проводили в объеме 15 мкл при температуре отжига праймеров 65°C с использованием набора HS Taq-ДНК-полимераза (Евроген, Россия) в течение 30 и 33 циклов для генотипирования и гаплотипирования соответственно.

### Статистическая обработка результатов

Для статистической обработки результатов использовали программы: Haploview 4.1 (<http://www.broadinstitute.org/haploview/haploview>) и Genetic Data Analysis (Lewis, P. O., and Zaykin, D. 2001. Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>).

Соответствие частот генотипов равновесному распределению по закону Харди–Вайнберга оценивали с помощью точного критерия, описанного в работе G. Abecasis и J. Wigginton [17], а также с помощью точного критерия Фишера.

Значимость различий частот встречаемости аллельных вариантов по отдельным молекулярно-генетическим маркерам и теоретических значений встречаемости определенных гаплотипов определяли с помощью стандартного критерия  $\chi^2$  с учетом поправки Йейтса. Величину фактора риска (OR) и доверительный интервал (CI95%) рассчитывали с помощью on-line-калькулятора ([www.openepi.com](http://www.openepi.com)).

Для определения неравновесного сцепления между маркерами и расчета теоретических частот встречаемости гаплотипов использовали алгоритм, предлагаемый программой Haploview 4.1 (EM – Expectation-maximization algorithm). Строгое неравновесное сцепление определяли как  $D' \geq 0.8$ , CI95% 0.7–0.99 [18].

Результаты определения теоретических частот встречаемости гаплотипов были подтверждены с использованием байесовского алгоритма программы PHASE 2.1.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### Частота встречаемости минорных аллельных вариантов гена *erap1* по трем маркерам снижена у больных АС

Используя набор аллель-специфических праймеров (табл. 1, рис. 1), мы определили частоты встречаемости 10 аллельных вариантов гена *erap1* и соот-

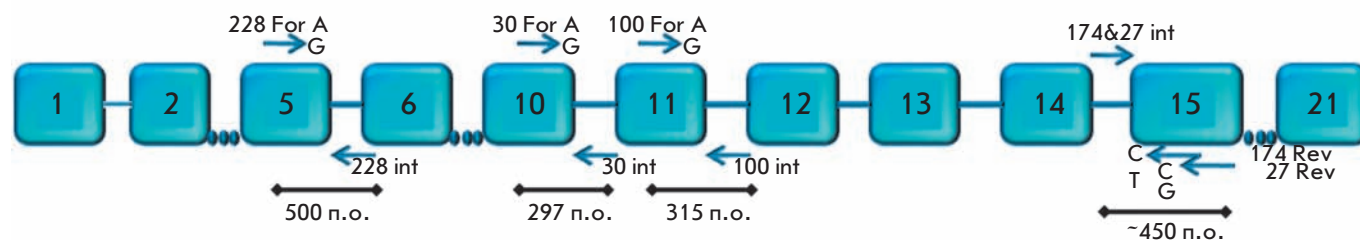
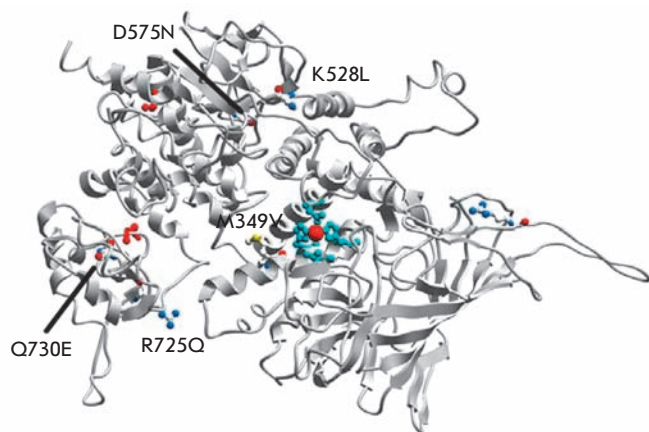


Рис. 1. Схема расположения праймеров для определения аллельных вариантов гена *erap1*. Показаны: экзоны и интроны гена *erap1*, номера экзонов, названия праймеров, длины получаемых продуктов ПЦР в п.о.



**Рис. 2.** Предполагаемая трехмерная структура белка ERAP1, смоделированная на основе структурной гомологии (по [11] с изменениями). Указаны положения аминокислотных замен, связанных с маркерами, по которым в настоящей работе определяли аллельные варианты гена *erap1* (синие сферы). Активный центр молекулы вокруг атома Zn (красный шарик) выделен голубым цветом.

ветствующих генотипов в выборке из 84 больных АС и в контрольной группе из 77 здоровых доноров, положительных по аллельному варианту *hla-B27*. Аллельные варианты гена *erap1* содержали различные молекулярно-генетические маркеры: rs2287987 (C/T, Met349Val), rs30187 (C/T, Lys528Arg), rs10050860 (C/T, Asp575Asn), rs17482078 (C/T, Arg725Gln) и rs27044 (C/G, Glu730Gln) – несинонимичные однонуклеотидные замены в кодирующей части гена, приводящие к возникновению аминокислотных замен в молекуле белка. Несинонимичные замены в кодирующей части гена *erap1* могут приводить к образованию функционально различных продуктов, способных, возможно, влиять на развитие аутоиммунной патологии или оказывать протективный эффект. Каждый из пары аллельных вариантов, определяемых по соответствующему маркеру, как показано ранее другими авторами [11–15], ассоциирован с повышенным риском развития АС. Два из пяти исследуемых маркеров “расположены” вблизи предполагаемых активных центров аминоксептидазы: rs2287987 – вблизи центра связывания иона  $Zn^{2+}$  [11], rs30187 – вблизи предполагаемого субстратсвязывающего кармана [19] (рис. 2).

В обеих выборках распределение генотипов по каждой паре аллельных вариантов всех пяти полиморфизмов не отклонялось значимо от равновесного распределения частот генотипов в популяции согласно закону Харди–Вайнберга.

Анализ результатов генотипирования показал, что частота встречаемости минорных аллельных вариантов гена по трем из пяти маркеров: rs2287987 ( $p < 0.002$ , OR = 0.35), rs10050860 ( $p < 0.004$ , OR = 0.39) и rs17482078 ( $p < 0.05$ , OR = 0.52), значимо снижена среди больных АС в российской популяции по сравнению со здоровыми донорами (табл. 2). По результатам ассоциативного анализа три аллельных варианта гена *erap1* статистически достоверно ассоциированы с повышенным риском развития АС: rs2287987 [T] (OR = 2.86), rs10050860 [C] (OR = 2.54) и rs17482078 [C] (OR = 1.91). В то же время наши результаты демонстрируют отсутствие достоверной ассоциации аллельных вариантов по полиморфизмам rs30187 и rs27044 с АС в российской популяции.

Снижение частоты встречаемости минорных аллелей по маркерам rs2287987, rs10050860 и rs17482078 сопровождается снижением количества гетерозигот по минорному аллелю и возрастанием количества гомозигот по противоположному варианту гена в группе больных по сравнению с контрольной группой. Гетерозиготность по маркерам rs30187 и rs27044, не ассоциированным с АС в российской популяции, наоборот, возрастает у больных, однако частота минорного аллельного варианта при этом меняется незначительно.

Полученные нами результаты в основном согласуются с результатами других исследователей. В ряде работ установлена ассоциация всех пяти использованных нами маркеров с риском развития АС [5, 6, 11], однако выборки больных и здоровых доноров в этих работах содержали значительную долю *hla-B27*-отрицательных доноров. В двух других исследованиях, выполненных на выборках, полностью или на 77–85% положительных по *hla-B27* [14, 15], показано отсутствие ассоциации с риском развития АС аллельных вариантов по маркерам rs30187 и rs17482078 и наличие ассоциации с маркерами rs2287987, rs10050860 и rs27044 в первом случае. Во второй работе с риском развития АС были ассоциированы аллельные варианты по маркерам rs10050860 и rs30187, но не rs27044.

В корейской популяции ассоциации с АС выявлены только для маркеров rs27044 и rs30187, тогда как частоты встречаемости аллельных вариантов по маркерам rs2287987, rs10050860 и rs17482078 не отличались достоверно в выборке больных и в контрольной группе [12].

Различия в результатах ассоциативного анализа, полученных разными группами, вероятно, связаны со значительными отличиями частот встречаемости рассматриваемых аллелей *erap1* в исследованных популяциях. Другой причиной несоответствия выводов процитированных работ может быть генетическая

Таблица 2. Частоты встречаемости аллельных вариантов и генотипов по исследуемым генетическим маркерам среди двух выборок

Маркер [полиморфный нуклеотид]	Больные АС, <i>n</i> = 84		Здоровые доноры, <i>n</i> = 77		p	OR (95%CI)		
	MAF* [нуклеотид минор- ного аллеля]	Число геноти- пов (частота)	MAF* [нуклеотид минор- ного аллеля]	Число генотипов (частота)				
rs2287987 [C/T]	0.09 [C]	CC	1 (0.01)	0.22 [C]	CC	3 (0.04)	0.002	0.35 (0.18–0.68)
		CT	13 (0.15)		CT	26 (0.36)		
		TT	70 (0.84)		TT	44 (0.60)		
rs30187 [C/T]	0.37 [T]	CC	29 (0.35)	0.33 [T]	CC	35 (0.45)	0.55	1.18 (0.75–1.87)
		CT	48 (0.57)		CT	33 (0.43)		
		TT	7 (0.08)		TT	9 (0.12)		
rs10050860 [C/T]	0.11 [T]	CC	66 (0.78)	0.23 [T]	CC	46 (0.60)	0.004	0.39 (0.21–0.73)
		CT	18 (0.21)		CT	26 (0.34)		
		TT	-		TT	5 (0.06)		
rs17482078 [C/T]	0.13 [T]	CC	65 (0.77)	0.21 [T]	CC	47 (0.61)	0.046	0.52 (0.29–0.95)
		CT	17 (0.20)		CT	27 (0.35)		
		TT	2 (0.02)		TT	3 (0.04)		
rs27044 [C/G]	0.33 [G]	GG	7 (0.08)	0.29 [G]	GG	9 (0.12)	0.47	1.23 (0.76–1.97)
		GC	42 (0.5)		GC	26 (0.34)		
		CC	35 (0.42)		CC	42 (0.55)		

\*MAF – частота минорного аллельного варианта.

разнородность по локусу *hla-B27* анализируемых авторами парных выборок больных АС и здоровых доноров. В нашей работе при формировании выборок мы особое внимание уделяли их генетической однородности по локусу *hla-B27* и однотипности клинических проявлений заболевания, что существенно снижало риск низкой достоверности выявляемых ассоциаций.

#### Определение теоретической частоты встречаемости гаплотипов на основе результатов генотипирования

По результатам генотипирования двух выборок была определена теоретическая частота встречаемости гаплотипов по исследуемым маркерам и проведен поиск гаплотипов, частота встречаемости которых достоверно повышена среди больных АС и, возможно, связанных с риском развития АС. С этой целью с использованием программы Haploview 4.1 была определена степень неравновесного сцепления (linkage disequilibrium) между парами аллельных вариантов по исследуемым маркерам. Полиморфизмы rs2287987, rs10050860 и rs17482078 находились в статистически достоверном попарном строгом неравновесном сцеплении ( $D' \geq 0.85$ , 95%CI 0.76–0.99, по [18]) и были объединены в блок. Для маркеров в блоке были рассчитаны теоретические частоты встречаемости гап-

типов в выборках больных АС и здоровых индивидов. Из дальнейшего анализа были исключены гаплотипы с расчетной частотой встречаемости менее 5%.

Гаплотип ССТ, по результатам анализа расчетных частот встречаемости гаплотипов, статистически достоверно ассоциирован с риском развития АС ( $p < 0.03$ , OR 1.96), в то время как расчетная частота гаплотипа ТТС достоверно ниже в выборке больных по сравнению с выборкой здоровых доноров ( $p < 0.003$ , OR 0.33) (табл. 3).

#### Определение фактических частот встречаемости гаплотипов *erap1* в выборке больных АС из российской популяции

С использованием попарных комбинаций аллель-специфических праймеров к исследуемым маркерам и образцов кДНК той же выборки больных определены фактические частоты встречаемости гаплотипов по пяти молекулярно-генетическим маркерам гена *erap1*. В табл. 4 представлено распределение частот встречаемости фактических гаплотипов в выборке больных по всем пяти маркерам, а также по тем трем из них, для которых нами показана статистически достоверная связь с риском развития АС при анализе отдельных маркеров. В таблице не приведены гаплотипы, встречаемость которых составила менее

Таблица 3. Расчетные частоты встречаемости гаплотипов по маркерам rs17482078/10050860/2287987, ассоциированным с риском развития АС в российской популяции

Гаплотип	Частота встречаемости среди больных АС, n = 84	Частота встречаемости среди здоровых доноров, n = 77	P	OR (95%CI)
ССТ	0.86	0.75	0.026	1.96 (1.12–3.46)
ТТС	0.08	0.2	0.003	0.33 (0.17–0.67)

Таблица 4. Распределение фактических гаплотипов в выборке больных АС российской популяции

Гаплотип*	Количество гаплотипов среди больных АС (частота встречаемости), n = 69
rs27044/17482078/10050860/30187/2287987	
<b>ССССТ</b>	70 (0.51)
<b>ГССТТ</b>	36 (0.26)
<b>ГСССТ</b>	8 (0.06)
<b>СССТТ</b>	7 (0.05)
<b>ГТТГТ</b>	7 (0.05)
<b>СТТС</b>	2 (0.01)
rs17482078/10050860/2287987	
<b>ССТ</b>	121 (0.88)
<b>ТТТ</b>	7 (0.05)
<b>ТТС</b>	2 (0.01)

\*Подчеркнуты и выделены жирным нуклеотиды, входящие в состав теоретически определенных рискового и протективного гаплотипов.

5%, за исключением гаплотипа ТТС, определенного как предположительно протективный на основе теоретических расчетов.

Фактическая частота встречаемости предположительно рискового гаплотипа ССТ среди больных АС составляет около 88%, что хорошо согласуется с теоретически рассчитанной частотой. Фактическая частота встречаемости предположительно протективного гаплотипа ТТС составляет около 1%, тогда

как теоретически рассчитанная величина равна примерно 8% (табл. 3). Эти различия, возможно, связаны с недостаточным для достоверного определения фактической частоты встречаемости протективного гаплотипа размером выборки больных АС.

Описанный в нашей работе аллельный вариант гена *erap1*, ассоциированный с повышенным риском развития АС, совпадает в большинстве позиций с вариантами, обнаруженными ранее на выборках больных и здоровых представителей европейских популяций (табл. 5).

Однако в настоящее время имеются противоречивые данные о рисковом гаплотипе по маркерам rs27044 и rs30187 в различных популяциях. Так, в работе Maksymowuch и соавт. [14] выявлена ассоциация С-аллеля (маркер rs27044) с риском развития АС, тогда как в работе Pazar и соавт. [15] показано, что G-аллель по тому же маркеру характерен для обоих выявленных рисковом гаплотипов. Причем два рисковом гаплотипа, описанных в данной работе [15], инвариантны по маркеру rs30187. Эти результаты, а также противоречивость данных об ассоциации аллельных вариантов гена *erap1* по маркерам rs27044 и rs30187 с риском развития АС, возможно, означают, что кодируемые данными полиморфизмами аминокислотные замены не влияют на активность аминопептидазы и ее участие в развитии АС. Описанные ассоциации могут быть вызваны как неоднородным составом выборок больных, так и генетической сцепленностью этих полиморфизмов с другими несино-

Таблица 5. Аллельные варианты *erap1*, ассоциированные с повышенным риском развития анкилозирующего спондилита в различных популяциях

rs27044	rs17482078	rs10050860	rs30187	rs2287987	Ссылка
C	-	C	T	-	[14]
G	C	C	T	T	[15]
G	C	C	C	T	[15]
G	C	C	T	-	[12]
G	-	-	T	-	[13]
-	C	C	-	T	Настоящая работа

нимичными заменами, определяющими изменение функциональных свойств аминопептидазы, которые могут быть существенны для развития АС.

Опубликованные результаты немногочисленных исследований *in vitro* свидетельствуют о значительном влиянии на активность аминопептидазы ERAP1 замены Lys528Arg, которая кодируется полиморфизмом rs30187. Goto и соавт. [19] показали, что вариант ERAP1, содержащий Arg в положении 528, имеет сниженную пептидазную активность по отношению к синтетическим субстратам и к природным гормонам – ангиотензину II и каллидину. В этой же работе [19] показано, что замена Gln730Glu, кодируемая полиморфизмом rs27044, и замена Asp575Asn, кодируемая полиморфизмом rs10050860, практически не влияют на активность пептидазы по отношению к синтетическим и природным субстратам. При транзientной экспрессии *erap1* в линии клеток меланомы показано, что аминокислотная замена Met349Val (полиморфизм rs2287987) увеличивает пептидазную активность ERAP1 в отношении синтетического субстрата [20]. Сопоставление аминокислотных замен, охарактеризованных в процитированных выше работах, с результатами ассоциативного анализа, проведенного как в нашей работе, так и другими авторами (табл. 5), позволяет предполагать, что некоторые из ассоциированных с АС несинонимичных замен способны изменять пептидазную активность ERAP1. Вместе с тем большая часть строго ассоциированных с заболеванием аллелей, вероятно, имеет иные функциональные проявления, поскольку соответствующие аминокислотные замены не влияют на активность белка в отношении синтетических субстратов.

Мнимые несоответствия результатов функциональных тестов и ассоциативного анализа могут быть

преодолены при определении гаплотипов, характеризующих выборки больных и здоровых. В нашей работе мы выявили рисковый ССТ- и протективный ТТС-гаплотипы по маркерам rs17482078/10050860/2287987. Представленность каждого из гаплотипов достоверно повышена в соответствующей выборке (табл. 4). Одна из кодируемых протективным гаплотипом замен – Met349Val – приводит к увеличению активности ERAP1 в отношении некоторых субстратов [20]. Поэтому можно предположить, что повышение пептидазной активности ERAP1 защищает от развития АС. Протективный эффект гаплотипа ТТС может быть связан с активностью ERAP1 в отношении рецепторов провоспалительных цитокинов или обеспечением правильной презентации пептидов на молекулах МНС-I. Напротив, несинонимичные замены рискового гаплотипа ССТ приводят, возможно, к повышению уровня мембраносвязанных форм РФНО-1, рецепторов ИЛ-6 и ИЛ-1.

Принимая во внимание, что АС относится к мультигенным заболеваниям, в дальнейшем, изучая роль ERAP1 в развитии АС, необходимо как определять функции аллельных вариантов гена, так и учитывать предполагаемое взаимодействие белка с продуктами других генов, ассоциированных с заболеванием. В реализации подобных взаимодействий, возможно, состоит функциональная роль несинонимичных замен в рисковом гаплотипе гена *erap1*, выявленном нами для популяции Центральной России. ●

*Работа выполнена при поддержке гранта программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и грантов Российского фонда фундаментальных исследований (№ 10-04-01771-а и 11-04-01585-а).*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- van der Linden S.M., Valkenburg H.A., de Jongh B.M., Cats A. // *Arthritis Rheum.* 1984. V. 27. № 3. P. 241–249.
- Pedersen O.B., Svedensen A.J., Ejstrup L., et al. // *Scand. J. Rheumatol.* 2008. V. 37. № 2. P. 120–126.
- Brown M.A., Laval S.H., Brophy S., Calin A. // *Ann. Rheum. Dis.* 2000. V. 59. № 11. P. 883–886.
- Reveille J.D., Maganti R.A. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2009. V. 649. P. 159–176.
- The Australo-Anglo-American Spondyloarthritis Consortium (TASC) // *Nature Genetics.* 2010. V. 42. № 2. P. 123–127.
- Wellcome Trust Case Control Consortium & The Australo-Anglo-American Spondylitis Consortium (TASC) // *Nature Genetics.* 2007. V. 39. № 11. P. 1329–1337.
- Toshihiro T., Hattori A., Shinako M., et al. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 34. P. 32275–32283.
- Cui X., Hawari F., Alsaaty S., et al. // *J. Clin. Invest.* 2002. V. 110. № 4. P. 515–526.
- Cui X., Rouhani N.F., Hawari F., et al. // *J. Immunology.* 2003. V. 171. № 12. P. 6814–6819.
- Cui X., Rouhani N.F., Hawari F., Levine J.S. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 28677–28685.
- Harvey D., Pointon J.J., Evans M.D., et al. // *Hum. Mol. Genet.* 2009. V. 18. № 21. P. 4204–4212.
- Choi C.-B., Kim T.-H., Jun J.-B., et al. // *Ann. Rheum. Dis.* 2010. V. 69. № 3. P. 582–584.
- Tsui F.W.L., Haroon N., Reveille D.J., et al. // *Ann. Rheum. Dis.* 2010. V. 69. № 4. P. 733–736.
- Maksymowych W.P., Inman R.D., Gladman D.D., et al. // *Arthr. & Rheum.* 2009. V. 60. № 5. P. 1317–1323.
- Pazar B., Safrani E., Gergely P., et al. // *J. Rheum.* 2010. V. 37. № 2. P. 379–384.
- Haroon N., Inman D.R. // *Nat. Rev. Rheum.* 2010. *Advanced online publication.*
- Wigginton J., Cutler D., Abecasis G.A. // *Am. J. Hum. Genet.* 2005. V. 76. № 5. P. 887–883.
- Gabriel S.B., Schaffner S.F., Nguyen H., et al. // *Science.* 2002. V. 296. № 5576. P. 2225–2229.
- Goto Y., Hattori A., Ishii Y., Tsujimoto M. // *FEBS Lett.* 2006. V. 580. P. 1833–1838.
- Kamphausen E., Kellert C., Abbas T., et al. // *Cancer Immun. Immunother.* 2010. V. 59. № 8. P. 1273–1284.