

УДК 577.218

# Минорный вариант однонуклеотидного полиморфизма rs3753381 увеличивает активность энхансера гена *SLAMF1*

Л. В. Путляева<sup>1\*</sup>, А. М. Шварц<sup>1</sup>, А. В. Клепикова<sup>2,3</sup>, И. Е. Воронцов<sup>4</sup>, И. В. Кулаковский<sup>1,4</sup>,  
Д. В. Купраш<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

<sup>2</sup>Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН, 127051, Москва, Большой Каретный пер., 19, стр. 1

<sup>3</sup>НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40

<sup>4</sup>Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 119991, Москва, ул. Губкина, 3

<sup>5</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра иммунологии, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

\*E-mail: lidia.mikhailova@mail.ru

Поступила в редакцию 08.02.2017

Принята к печати 31.05.2017

**РЕФЕРАТ** Ген *SLAMF1* кодирует трансмембранный гликопротеин CD150, экспрессируемый на поверхности Т- и В-лимфоцитов, НК-клеток, дендритных клеток, субпопуляций базофилов и макрофагов. При помощи биоинформатического и мутационного анализа регуляторных элементов, перекрывающихся с полиморфными позициями, мы провели поиск функциональных регуляторных полиморфизмов локуса *SLAMF1*, ассоциированных с аутоиммунными процессами. Анализ активности гена-репортера в В-клеточных линиях MP-1 и Raji показал, что введение минорного варианта полиморфизма rs3753381 (G > A), ассоциированного с миастенией гравис, более чем вдвое увеличивает энхансерную активность регуляторного участка локуса, содержащего rs3753381. При анализе нуклеотидного контекста в окрестности rs3753381 установлено, что минорный вариант этого полиморфизма улучшает сайты связывания факторов транскрипции семейств FOX и NFAT и ядерных рецепторов семейства RXR. Внесение мутаций, нарушающих какие-либо из этих сайтов, приводит к снижению энхансерной активности как в клетках MP-1, так и в Raji, причем каждая из двух использованных В-клеточных линий экспрессирует специфический набор таких факторов. Таким образом, минорный вариант полиморфизма rs3753381 может быть ассоциирован с миастенией гравис за счет модуляции экспрессии *SLAMF1*, предположительно, в В-лимфоцитах, участвующих в патологических аутоиммунных реакциях.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** аутоиммунитет, некодирующий полиморфизм, регуляция транскрипции, В-клетки.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** SLAM – сигнальная молекула активации лимфоцитов; CD – кластер дифференцировки; IFN- $\gamma$  – интерферон гамма; TCR – Т-клеточный рецептор; IL – интерлейкин.

## ВВЕДЕНИЕ

Рецептор *SLAMF1/CD150*, кодируемый геном *SLAMF1*, является трансмембранным гликопротеином массой 70 кДа, который экспрессируется на поверхности различных клеток гемопоэтического ряда человека и мыши: В- и Т-лимфоцитов (на разных стадиях дифференцировки), дендритных клеток, субпопуляций базофилов и макрофагов [1, 2]. Экспрессия *SLAMF1* повышается при активации упомянутых клеток, а также при активации моноцитов и тучных клеток [1, 3–5]. В Т-лимфоцитах

*SLAMF1* оказывает ко-стимулирующее действие на антигенспецифичную, CD28-независимую пролиферацию и индуцирует синтез IFN- $\gamma$  [6], тогда как в В-лимфоцитах он индуцирует и усиливает пролиферацию и синтез иммуноглобулинов [7]. *SLAMF1* также важен для двунаправленной Т-В-клеточной стимуляции. Белок *SLAMF1* может служить рецептором вируса кори [2], участвовать в процессе распознавания грамотрицательных бактерий и последующей активации макрофагов для уничтожения бактерий [8]. На мышинных моделях показано, что на-

рушение сигнального пути данного белка может приводить к развитию аутоиммунных заболеваний и иммунодефицитных состояний [9–11].

На данный момент хорошо известна роль четырех представителей семейства SLAM/CD2 в развитии аутоиммунных состояний. Изменения в нуклеотидных последовательностях генов *Ly108*, *Ly9*, *CD84* и *CD244* ассоциированы с запуском аутоиммунных процессов не только в мышинных моделях, но и на ограниченной когорте пациентов. Наличие альтернативных аллелей гена *Ly108* у мышей сильно влияет на центральную толерантность при развитии В- и Т-клеток, ввиду участия гена *Ly108* в TCR-опосредованной стимуляции ключевых проапоптотических молекул BIM и FasL [12], регуляции иммунологической толерантности и прогрессии клеточного цикла [13]. Кроме того, *Ly108* и *CD84* вместе с их адаптером SAP (SLAM-ассоциированный белок) участвуют в двунаправленной Т-В-клеточной стимуляции, что необходимо для формирования герминальных центров [14]. Имеются данные о связи однонуклеотидных полиморфизмов генов некоторых представителей семейства SLAM/CD2 с риском развития ряда аутоиммунных заболеваний. Известно, что минорный вариант rs509749 гена *CD229* (*Ly9*, *SLAMF3*) вызывает изменение аминокислотной последовательности ITSM-мотива *CD229* и последующее изменение аффинности рецептора к адаптеру SAP, что, в свою очередь, может приводить к увеличению риска развития системной красной волчанки [15, 16]. Имеются также данные об ассоциации гетерозиготного варианта (GA) однонуклеотидного полиморфизма rs6427528 гена *CD84* с положительным ответом на терапию этанерцептом при псориазе и ревматоидном артрите [17] и двух полиморфизмов гена *CD244* (2B4) – rs3766379 и rs6682654 – с прогрессией ревматоидного артрита и системной красной волчанки в когорте японских

пациентов [18]. Также известно о корреляции между полиморфизмом rs2049995 в гене *SAP*, кодирующим основной белок-адаптер представителей семейства SLAM, с развитием системной красной волчанки [19]. Все это свидетельствует о связи изменений в нуклеотидных последовательностях генов представителей семейства SLAM с развитием различных аутоиммунных заболеваний.

Известны два полиморфизма *SLAMF1*, ассоциированные с аутоиммунными процессами (табл. 1) [20, 21]. Результаты генотипирования, приведенные в упомянутых статьях, позволяют считать, что минорный вариант полиморфизма rs11265455 связан с риском развития сахарного диабета типа 2, а минорный вариант полиморфизма rs3753381 (G>A) ассоциирован с повышенным риском развития миастении гравис.

Согласно данным, полученным на мышах с индуцированным ожирением, сахарный диабет типа 2, считавшийся ранее только метаболическим заболеванием, связанным с нарушением взаимодействия инсулина и клеток тканей организма, также имеет аутоиммунную природу [22, 23] и может развиваться на фоне других аутоиммунных заболеваний [24, 25]. Важную роль в развитии диабета типа 2 играют В-клетки, вовлеченные в метаболизм глюкозы, участвующие в активации провоспалительных макрофагов и Т-клеток и продукции уникального профиля IgG-аутоантител у людей, страдающих ожирением. Показано, что в мышинной модели диабета типа 2 анти-CD20-антитела вызывают уменьшение активации Т-клеток и улучшают метаболизм глюкозы [22], а использование салицилатов и антагонистов IL-1, снижающих уровень глюкозы, прошло клинические испытания [26].

Приобретенная миастения гравис – редкое аутоиммунное заболевание, которое клинически про-

Таблица 1. Полиморфизмы локуса гена *SLAMF1*, ассоциированные с аутоиммунными процессами

SNP	rs11265455	rs3753381
Энхансер гена <i>SLAMF1</i>	D	E
Ассоциация с заболеваниями	Сахарный диабет типа 2	Миастения гравис
Риск-аллель	G (минорный)	A (минорный)
Альтернативный аллель	A (мажорный)	G (мажорный)
Частота встречаемости риск-аллеля	0.199	0.25
P-значения	$3.9 \times 10^{-5}$	$9.63 \times 10^{-6}$
OR	1.32 (1.16–1.47)	1.04 (0.87–1.25)
TFBS, предположительно разрушаемые минорным вариантом SNP	NFAT	RXR, FOX

Примечание: OR – отношение рисков развития заболевания; риск-аллель / аллель, ассоциированный с риском возникновения заболевания; TFBS – сайт связывания транскрипционного фактора.

является утомляемостью и слабостью поперечно-полосатых мышц [21], [27]. Пусковой механизм для активации системы аутоиммунного ответа при миастении гравис до сих пор не выяснен: аутоантитела начинают вырабатываться против никотиновых ацетилхолиновых рецепторов, расположенных в окончании двигательного нерва, что приводит к ухудшению передачи нервного импульса к мышце [28]. Инъекция фракции иммуноглобулинов из сыворотки больного миастенией гравис, содержащей антитела анти-AChR (обнаруживаются у 85% пациентов) и анти-MuSK (у 15% пациентов), индуцировала симптомы миастении у животных [9, 29, 30]. При миастении гравис эффективна терапия, направленная на уменьшение количества В-клеток моноклональными антителами против CD20 (ретуксимаб) [31]. Известным фактором риска для развития аутоиммунных заболеваний является также изменение сигналинга Т-клеточного рецептора (TCR), что, в свою очередь, может влиять на систему селекции в тимусе, активность Т-хелперов и регуляторных Т-клеток [32]. Развитие многих аутоиммунных заболеваний, таких, как системная красная волчанка, полимиозит, дерматомиозит, ревматоидный артрит, синдром Шегрена, рассеянный склероз, приобретенный буллезный эпидермолиз, болезнь Крона, язвенный колит и аутоиммунный гепатит, связано с нарушением производства NKT-клеток (Natural Killer T-cell) [33]. Существуют данные о том, что увеличение в 2 раза экспрессии *SLAMF1* у мышей NOD.Nkrlp1b.Tg(Slamf1) удваивает продукцию NKT-клеток в тимусе посредством гомотипических взаимодействий (SLAM-SLAM) на поверхности незрелых NKT-клеток и CD4+CD8+-тимоцитов, необходимых для развития NKT-клеток [9, 34]. Также небольшое повышение экспрессии CD150-SLAMF1 увеличивает продукцию IL-4 и IL-17 в ответ на стимуляцию через TCR [34]. Имеются данные, что *SLAMF1* участвует в регуляции продукции IFN- $\gamma$  CD4+ Т-клетками, что также может быть опосредованно связано с патогенезом и иммунорегуляцией миастении гравис [3]. Это позволяет предположить, что увеличение продукции *SLAMF1* под действием аллельного варианта однонуклеотидного полиморфизма может быть одним из звеньев в цепи развития аутоиммунных процессов.

Недавно мы охарактеризовали ряд регуляторных областей гена *SLAMF1*, в том числе промотор (297–0 относительно старта трансляции) и три энхансерных элемента примерно по 2.5 т.п.н., два из которых находятся в третьем интроне и один – на расстоянии 3 т.п.н. после кодирующей последовательности [35]. Активность регуляторных элементов изучена на клеточных линиях Raji и MP-1 (модели лимфомы

Беркитта и острого лимфобластного лейкоза соответственно). Было показано, что экспрессия мРНК *SLAMF1* находится под контролем факторов транскрипции EBF1, SP1, STAT6, IRF4, NF- $\kappa$ B, ELF1, TCF3 и SPI1/PU.1, связывающихся с промоторной и энхансерными областями.

В настоящей работе представлены данные еще по двум энхансерным элементам локуса гена *SLAMF1* (далее энхансеры E и D), в которых локализованы два полиморфизма, rs3753381 и rs11265455, ассоциированные с аутоиммунными процессами. Мы изучили влияние каждого из этих полиморфизмов на экспрессию гена *SLAMF1* в В-клетках. Энхансер E, в составе которого присутствует полиморфизм rs3753381, находится в третьем интроне гена *SLAMF1*, а энхансер D – на расстоянии 1.5 т.п.н. перед кодирующей областью гена.

В результате исследования полиморфизмов локуса гена *SLAMF1* мы показали, что ни минорный, ни мажорный варианты полиморфизма rs11265455 практически не влияют на активность промотора *SLAMF1*, в то время как минорный вариант полиморфизма rs3753381 (энхансер E) повышает активность промотора *SLAMF1* более чем в 2 раза. Мы идентифицировали FOX, RXR и NFAT как семейства ядерных белков, связывание которых зависит от аллельного варианта rs3753381, и выдвинули предположение о конкретных членах этих семейств, специфичных для исследованных клеточных линий (HNF4G, RXRB и FOXO2 в MP-1, и NFATC2/3 и NR2C1 в Raji).

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Клеточная культура и процедура трансфекции

Клетки MP-1 и Raji культивировали в питательной среде RPMI («ПанЭко») с добавлением 10% фетальной сыворотки телят, L-глутамин, антибиотиков, незаменимых аминокислот, HEPES и пирувата натрия. Трансфекцию проводили с использованием Neon Transfection System (Life Technologies, США) из расчета  $2 \times 10^6$  клеток MP-1 и  $7 \times 10^6$  клеток Raji на одну трансфекцию. Активность люциферазы анализировали через 24 ч с помощью Dual Luciferase Assay kit (Promega, США).

### Плазмидные конструкции

Генно-инженерные манипуляции проводили по стандартным методикам, использовали ферменты производства Fermentas/ThermoScientific (Литва). Для создания конструкций pGL3-rs3753381(G) и pGL3-rs11265455(A) последовательности энхансеров E и D соответственно были амплифицированы с праймерами, содержащими сайты рестрикции

Таблица 2. Олигонуклеотидные праймеры, использованные в работе

Праймер	Нуклеотидная последовательность 5'-3'	Применение
E150-5Sal (for)	TTTTGTCGACCCTGTACCTTATTCT	Аmplификация энхансера E и введение сайтов рестрикции SalI и BglII
E150-5Bgl2 (rev)	TTTAGATCTATCCTTGCCTTAAGGC	
rs3753381-F	ATTTTTACAGAGTTCACAGCTTCCAGA	Конструирование «rs3753381(A)»
rs3753381-R	CTGTGAACTCTGTAAAAATGTTTACTTGGA	
S1enh7F	AGAAGAATTTGGGGGCAGAGAGGACT	Аmplификация энхансера D и введение сайта рестрикции SalI
S1enh7SalR (rev)	AAAAGTCGACCCGCCCTTTTTCATGAGTAAAC	
for G RXRA	TACGGATTTATCAGCTTCCAGAAAA	Конструирование «mut RXR G»
rev G RXRA	AAGCTGATAAATCCGTAAAAATGT TTAC	
for A RXRA	TACAGATTTATCAGCTTCCAGAAAA	Конструирование «mut RXR A»
rev A RXRA	AGCTGATAAATCTGTAAAAATGT TTAC	
for G FOXO3	CATTACAACGGAGTTCACAGCTT	Конструирование «mut FOX G»
rev G FOXO3	CTCCGTTGTAATGTTTACTTGGATG	
for A FOXO3	CATTACAACAGAGTTCACAGCTT	Конструирование «mut FOX A»
rev A FOXO3	CTCTGTTGTAATGTTTACTTGGATG	

SalI и BglII (только SalI в случае энхансера D), и затем клонированы в вектор WT SLAMF1 [35], расщепленный по сайтам BamHI–NcoI вместе с фрагментом вектора pGL3-basic, расщепленным по сайтам SalI–NcoI. На базе конструкций pGL3-rs3753381(G) и pGL3-rs11265455(A) были созданы конструкции с альтернативными вариантами соответствующих полиморфизмов – rs3753381(A) и rs11265455(G). Мутации в сайты связывания белков семейств RXR и FOX вносили с помощью направленного мутагеназа коровых последовательностей сайтов с использованием соответствующих праймеров. Мутагенез проводили при помощи двухступенчатой ПЦР, полученные конструкции очищали с помощью набора NucleoBond Xtra Midi Kit (Macherey-Nagel, Германия) и проверяли секвенированием по методу Сэнгера. Нуклеотидные последовательности праймеров представлены в табл. 2.

#### Биоинформатический анализ сайтов связывания

Геномные сегменты в окрестности полиморфизмов rs3753381 и rs11265455 локуса гена SLAMF1 анализировали с использованием общедоступных данных ChIP-Seq, полученных для B-лимфобластоидной клеточной линии GM12878 и представленных в сервисе UCSC Genome Browser [36]. В качестве признаков регуляторных элементов мы рассматривали наличие области ацетилирования Lys27 в гистоне 3 (H3K27Ac) [37]; высокую чувствительность к ДНКазе I [38] по данным DNase-Seq проекта ENCODE для клеточной линии GM12878, схожей по этиологии с клеточными линиями MP-1 и Raji; и наличие экспериментально определенных участков связывания

факторов транскрипции [39]. Предсказание сайтов связывания транскрипционных факторов, перекрывающихся с позициями полиморфизмов, осуществлено с использованием коллекции мотивов HOCOMO3 [40]. Влияние аллельных вариантов на предсказанную аффинность связывания оценивали с помощью программы PERFECTOS-APE [41] с настройками по умолчанию.

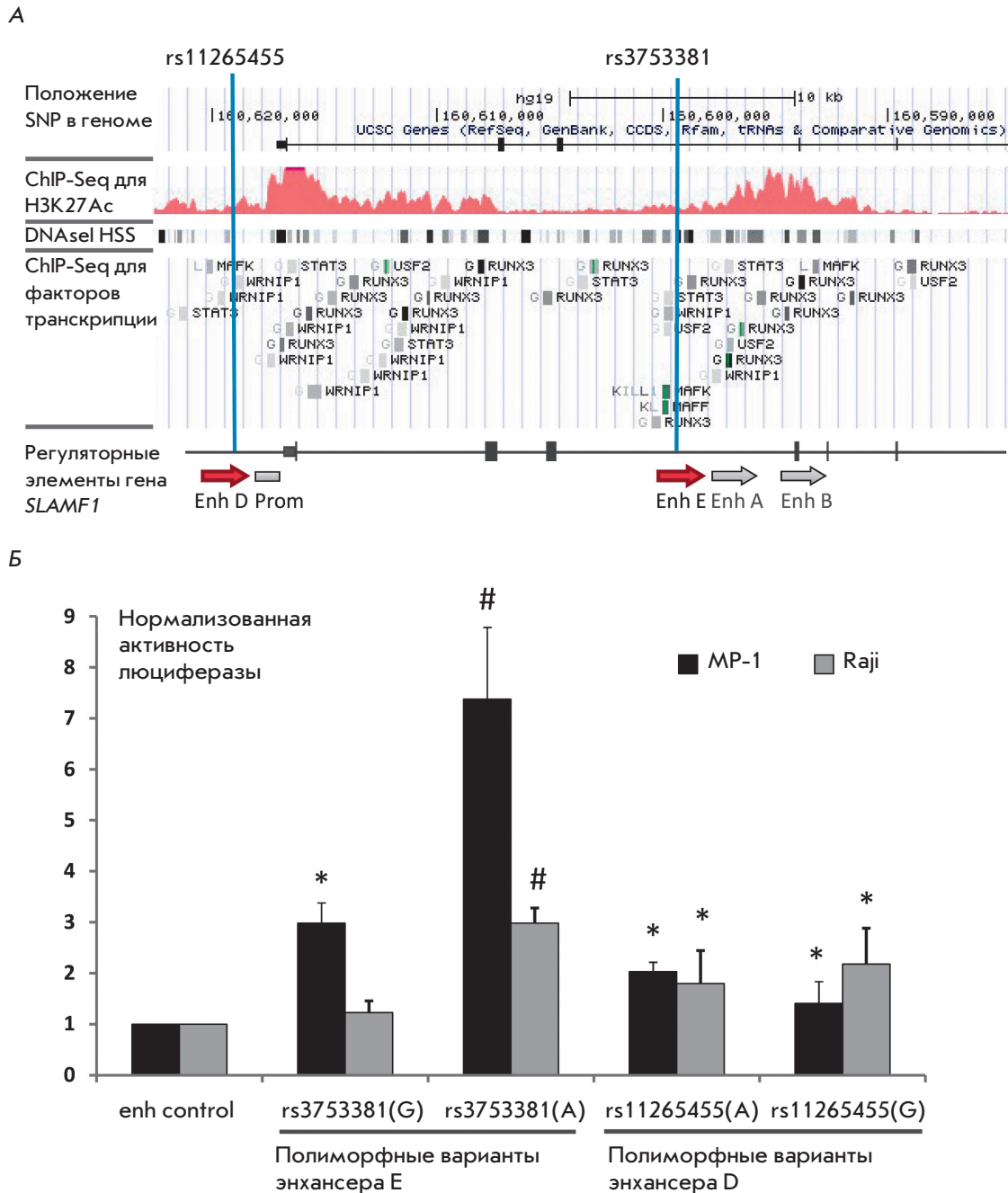
#### Анализ дифференциальной экспрессии генов

Образцы MP-1 и Raji, проанализированные в нашей работе, получены в [35]. Прочтения, полученные в результате секвенирования, доступны в Архиве коротких прочтений NCBI (NCBI Sequence Read Archive), идентификационный номер проекта PRJNA313457.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

##### Минорный вариант полиморфизма rs3753381 увеличивает активность энхансера SLAMF1

Ранее мы описали промотор и три энхансера гена SLAMF1 – A, B и C, признаки регуляторных элементов в которых были ярко выражены [35] (рис. 1A, показаны энхансеры A и B, обозначены серыми стрелками). В нашей работе мы выбрали еще две предполагаемые регуляторные области для анализа возможного влияния изучаемых полиморфизмов на регуляцию экспрессии SLAMF1: полиморфизм rs3753381 входит в состав предполагаемого энхансера E (третий интрон SLAMF1), а полиморфизм rs11265455 находится в предполагаемом энхансере D – на расстоянии 1500 п.н. перед кодирующей областью гена (рис. 1A, показаны красными стрелка-



**Рис. 1.** Анализ предполагаемых энхансеров в локусе гена *SLAMF1*. **A** – схематическая карта расположения регуляторных элементов локуса *SLAMF1*. Серыми стрелками показаны энхансеры А и В, описанные нами ранее [35], толстыми черными линиями – экзоны гена *SLAMF1*, тонкими – интроны. Красная гистограмма – уровень ацетилирования H3K27, прямоугольниками отмечены области гиперчувствительности к ДНКазе I и области связывания транскрипционных факторов по данным анализа ChIP-Seq проекта ENCODE. Вертикальными синими линиями схематично обозначено расположение полиморфизмов rs3753381 и rs11265455. **B** – влияние аллельных вариантов полиморфизмов rs3753381 и rs11265455 на активность энхансеров E и D. Столбики соответствуют экспрессии гена-репортера в клеточных линиях MP-1 и Raji, нормализованной относительно конструкции, содержащей контрольный фрагмент без энхансерной активности [35]. Представленные данные получены из трех или более независимых экспериментов со средними значениями с учетом стандартной ошибки. «\*» обозначает статистически достоверное отличие от контрольной конструкции; «#» – статистически значимое отличие конструкции, содержащей минорный вариант полиморфизма rs3753381, от конструкции, содержащей последовательность с мажорным вариантом ( $P < 0.05$ , согласно *t*-критерию Стьюдента). Enh – энхансер; Prom – промотор

ми). Эти регуляторные элементы были клонированы в два этапа (см. «Экспериментальную часть») в вектор WT *SLAMF1* [35]. Все конструкции стимулировали активность промотора *SLAMF1*, что подтверждает функцию D и E как возможных энхансеров транскрипции.

Далее в последовательности энхансерных элементов D и E были введены единичные замены таким образом, чтобы заменить последовательности полиморфизмов rs11265455 и rs3753381 альтернативными вариантами, ассоциированными с развитием сахарного диабета типа 2 и миастении гравис соответственно (см. табл. 1).

Оба предполагаемых энхансерных элемента увеличивают активность промотора *SLAMF1* (см. рис. 1Б) по сравнению с ранее описанной [35] контрольной последовательностью, длина которой соответствует тестируемому энхансерным элементам, но не обогащена сайтами связывания транскрипционных факторов и меткой ацетилирования H3K27. Примечательно, что активность энхансера E в клеточной линии MP-1 была существенно выше, чем в линии Raji, а активность энхансера D оказалась невысокой и была примерно одинакова в обеих клеточных линиях. Поскольку данные клеточные линии имеют схожую степень зрелости и этиологию, различия в активности предполагаемых энхансерных элементов, по-видимому, можно объяснить различием в профилях экспрессии транскрипционных факторов в MP-1 и Raji.

На рис. 1Б показано, что присутствие минорного варианта полиморфизма rs3753381 увеличивает активность энхансера E в обеих клеточных линиях, а минорный вариант полиморфизма rs11265455 не оказывает значимого влияния на активность промотора *SLAMF1* ни в одной из изученных линий. Поэтому мы продолжили изучать только влияние полиморфизма rs3753381 на экспрессию гена *SLAMF1*.

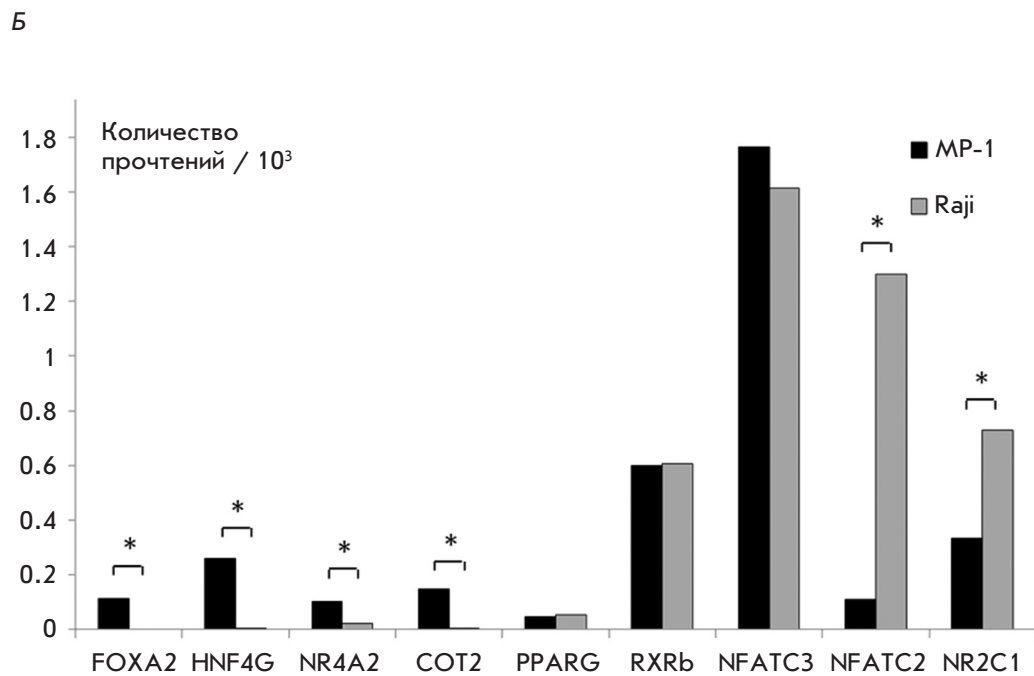
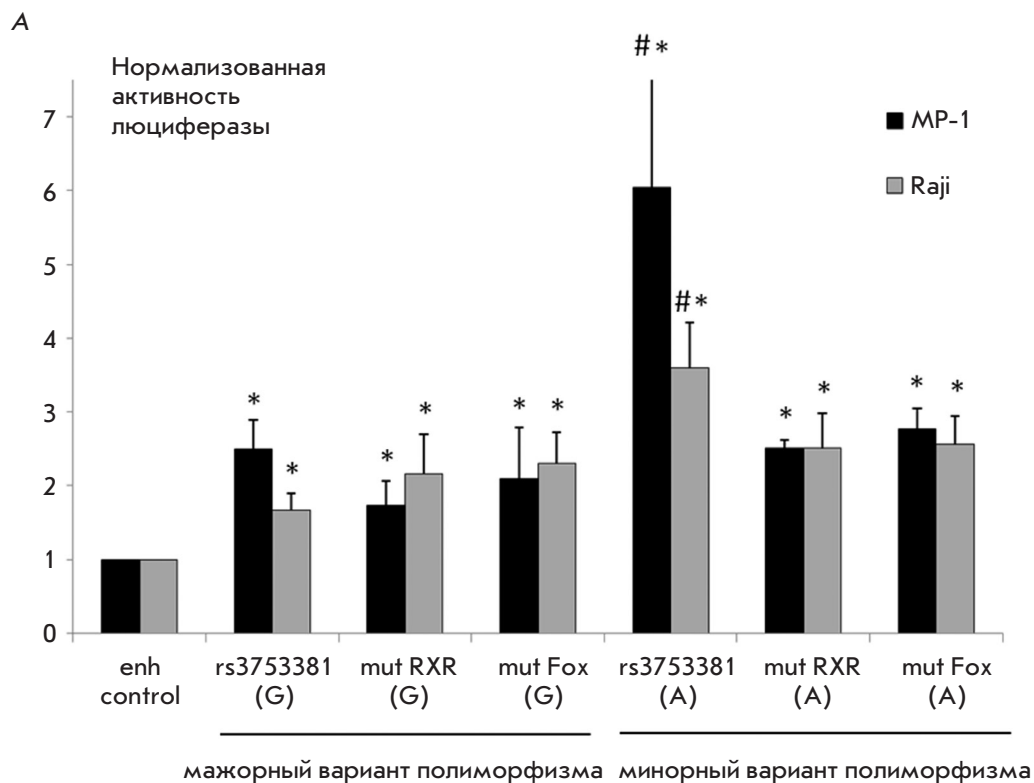
### **Мутации сайтов связывания факторов транскрипции RXR и FOX угнетают активность энхансера E в случае минорного варианта полиморфизма rs3753381**

Для объяснения значительного увеличения активности энхансера E при введении минорного варианта (A) полиморфизма rs3753381 был проведен биоинформатический анализ сайтов связывания факторов транскрипции, на которые мог повлиять изучаемый полиморфизм. С помощью программы PERFECTOS-APR мы провели анализ сайтов, перекрывающихся с rs3753381 и зависимых от изменения аллельного варианта. Было установлено, что с областью полиморфизма rs3753381 могут связываться различные ядерные белки семейств NFAT, RXR и FOX, и их

сайты связывания сильнее в случае минорного варианта (A). Предсказанные сайты были мутированы, а эффекты мутаций проверены в системе с геном-репортером (рис. 2А).

Мутации сайтов связывания ядерных белков семейств RXR и FOX значительно снижают активность энхансера относительно минорного варианта rs3753381. Для уточнения результатов мутагенеза mut FOX и mut RXR был проведен детальный биоинформатический анализ последовательности rs3753381 и области 20 п.н. до и после изучаемого полиморфизма. Были выбраны наиболее достоверные модели сайтов связывания из базы данных HOCOMOCS и с помощью PERFECTOS-APR проведен совместный анализ всех шести вариантов последовательности. Были отфильтрованы только предсказанные сайты с P-значением не хуже 0.001 для дикого типа последовательности с аллелем 'A'. Затем были рассмотрены только предсказания, в которых аффинность уменьшалась либо не изменялась у всех альтернативных вариантов последовательности (т.е. для аллеля 'G' либо внесенных мутаций). Для дальнейшего анализа были выбраны только белки, экспрессирующиеся в клеточных линиях MP-1 и Raji по данным экспрессионного профилирования (рис. 2Б, рис. 3).

В клеточной линии MP-1 активно экспрессируются HNF4G, NR4A2, COT2 и PPARG, что может объяснять значительное уменьшение активности энхансера E при повреждении сайтов связывания вышеописанных факторов вследствие мутации mut RXR (рис. 2А, конструкции mut RXR (A) и mut RXR (G)). В клеточной линии Raji высоко экспрессируются белки RXRB и NR2C1, чьи сайты связывания могут быть затронуты мутацией mut RXR, следовательно, нарушение связывания каждого из них может вносить свой вклад в уменьшение активности энхансера E. Из факторов семейства FOX, сайты которых могут быть разрушены соответствующей мутацией, в клеточной линии MP-1 активно экспрессируется FOXA2. В клеточной линии Raji экспрессируются белки семейства NFAT (NFATC2 и NFATC3), потенциально связывающие этот же участок. Также имеются основания предполагать, что каждая из мутаций: mut FOX(A), mut FOX(G), mut RXR(A) и mut RXR(G) затрагивает сайт связывания HNF4G, и именно это обуславливает падение активности энхансера E в перечисленных конструкциях в линии MP-1. Суммируя данные о мутациях mut RXR и mut FOX, можно предположить, что при мутации mut RXR может происходить нарушение связывания HNF4G, RXRB, NR4A2, COT2 и PPARG в MP-1, и RXRB и NR2C1 в Raji; а в случае мутации mut FOX – HNF4G и FOXA2 в MP-1, и NFATC2, NFATC3 в Raji. Таким



**Рис. 2.** Влияние аллельных вариантов полиморфизма rs3753381 на связывание транскрипционных факторов. **А** – влияние мутаций сайтов связывания RXR и FOX на активность энхансера E. Обозначения как на рис. 1Б. **Б** – экспрессия транскрипционных факторов, на эффективность связывания которых могли повлиять мутации mut RXR и mut FOX. Столбики соответствуют нормализованному количеству прочтений, полученных в результате экспрессионного профилирования клеточных линий MP-1 и Raji. «\*» обозначает значимое различие между образцами (FDR < 0.05)

образом, можно сделать вывод, что при изменении главного варианта полиморфизма rs3753381(G) на минорный rs3753381(A) может изменяться связывание транскрипционных факторов семейств RXR, FOX и NFAT, отличающихся в случае клеточных линий MP-1 и Raji. База мотивов HOCOMOCS покрывает только 600 более чем из 1500 факторов [42]

транскрипции человека. Нельзя исключить связывания с полиморфной областью энхансера и других членов описываемых семейств.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

В представленной работе показана функциональная значимость полиморфизмов локуса *SLAMF1*,

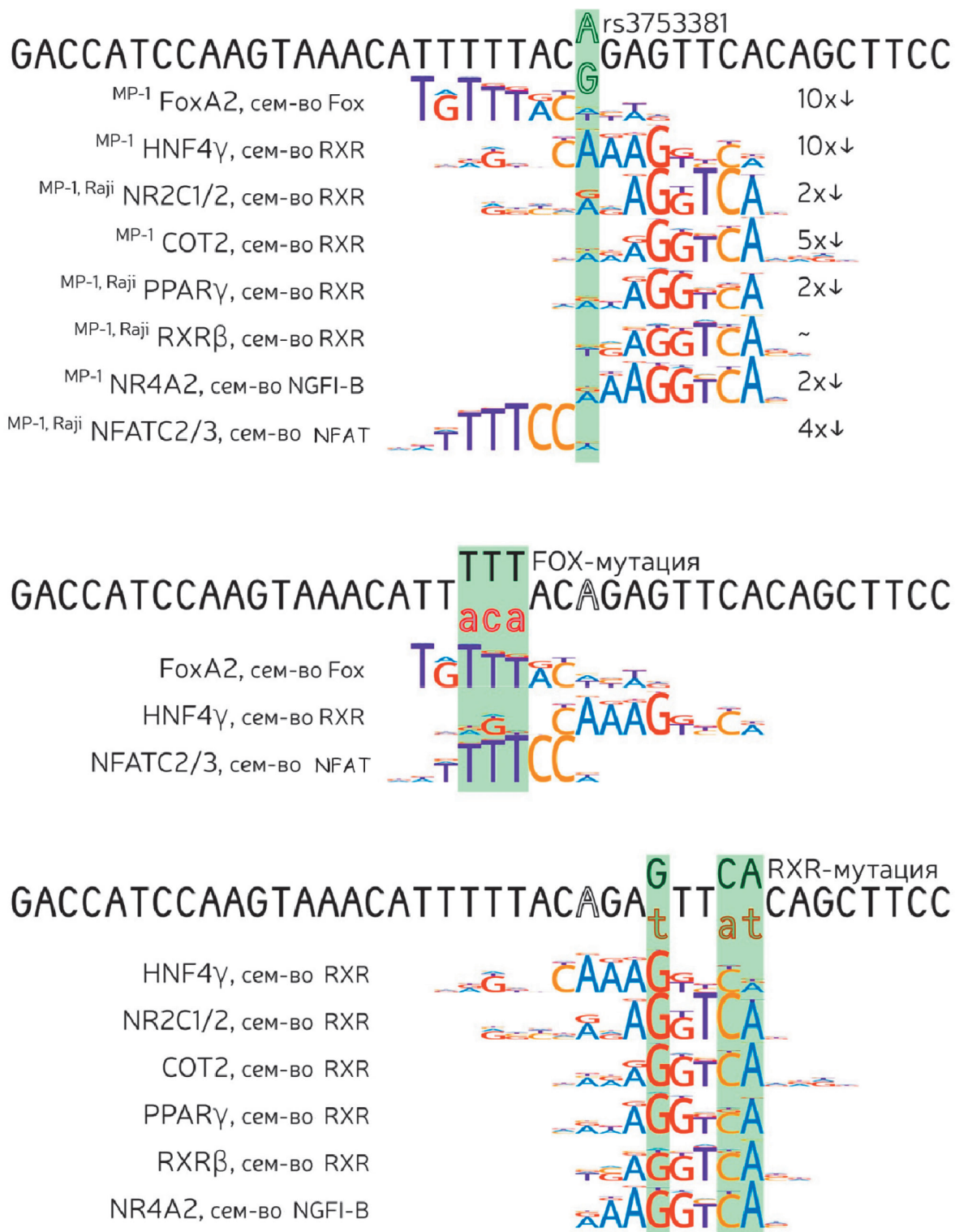


Рис. 3. Изменение ожидаемой эффективности связывания различных транскрипционных факторов при мутации сайтов связывания RXR и FOX и альтернативных вариантах полиморфизма rs3753381. Названия и визуализация сайтов связывания факторов расположены под соответствующим фрагментом последовательности энхансера E. Также указаны предсказанные изменения аффинности сайтов связывания, вызванные сменой аллельного варианта (G > A)



ассоциированных с аутоиммунными процессами, что указывает на возможную связь полиморфизмов rs3753381 и rs11265455 с регуляцией экспрессии гена *SLAMF1*. Используя экспериментальную модель В-лимфобластоидных клеточных линий человека, выявлена взаимосвязь между минорным вариантом rs3753381 и увеличением активности энхансера *SLAMF1* более чем в 2 раза. При использовании биоинформатического анализа последовательностей минорных и мажорных вариантов полиморфизмов предсказано, что транскрипционные факторы семейства FOX и NFAT и ядерные рецепторы семейства

RXR могут участвовать в повышении активности энхансера элемента E в случае минорного варианта полиморфизма rs3753381. Показано, что мутация предсказанных сайтов связывания снижает активность энхансера E, содержащего минорный вариант полиморфизма rs3753381. Также установлено, что изменение аллельного варианта полиморфизма rs11265455 не оказывает значимого воздействия на экспрессию *SLAMF1*. ●

Работа поддержана грантом РФФ  
(№ 14-14-01140).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Cannons J.L., Tangye S.G., Schwartzberg P.L. // *Annu. Rev. Immunol.* 2011. V. 29. P. 665–705.
- Sidorenko S.P., Clark E.A. // *Nat. Immunol.* 2003. V. 4. № 1. P. 19–24.
- Cocks B.G., Chang C.C., Carballido J.M., Yssel H., de Vries J.E., Aversa G. // *Nature.* 1995. V. 376. № 6537. P. 260–263.
- Bleharski J.R., Niazi K.R., Sieling P.A., Cheng G., Modlin R.L. // *J. Immunol.* 2001. V. 167. № 6. P. 3174–3181.
- Kiel M.J., Yilmaz O.H., Iwashita T., Yilmaz O.H., Terhorst C., Morrison S.J. // *Cell.* 2005. V. 121. № 7. P. 1109–1121.
- Aversa G., Carballido J., Punnonen J., Chang C.C., Hauser T., Cocks B.G., de Vries J.E. // *Immunol. Cell Biol.* 1997. V. 75. № 2. P. 202–205.
- Punnonen J., Cocks B.G., Carballido J.M., Bennett B., Peterson D., Aversa G., de Vries J.E. // *J. Exp. Med.* 1997. V. 185. № 6. P. 993–1004.
- Berger S.B., Romero X., Ma C., Wang G., Faubion W.A., Liao G., Compeere E., Keszei M., Rameh L., Wang N., et al. // *Nat. Immunol.* 2010. V. 11. № 10. P. 920–927.
- Berrih-Aknin S., Ragheb S., Le Panse R., Lisak R.P. // *Autoimmunity Rev.* 2013. V. 12. № 9. P. 885–993.
- Keszei M., Latchman Y.E., Vanguri V.K., Brown D.R., Detre C., Morra M., Arancibia-Carcamo C.V., Paul E., Calpe S., Castro W., et al. // *Internat. Immunol.* 2011. V. 23. № 2. P. 149–158.
- Huang Y.H., Tsai K., Ma C., Vallance B.A., Priatel J.J., Tan R. // *J. Immunol.* 2014. V. 193. № 12. P. 5841–5853.
- Snow A.L., Marsh R.A., Krummey S.M., Roehrs P., Young L.R., Zhang K., van Hoff J., Dhar D., Nichols K.E., Filipovich A.H., et al. // *J. Clin. Invest.* 2009. V. 119. № 10. P. 2976–2689.
- Kumar K.R., Li L., Yan M., Bhaskarabhatla M., Mobley A.B., Nguyen C., Mooney J.M., Schatzle J.D., Wakeland E.K., Mohan C. // *Science.* 2006. V. 312. № 5780. P. 1665–1669.
- Wang A., Batteux F., Wakeland E.K. // *Curr. Opin. Immunol.* 2010. V. 22. № 6. P. 706–714.
- Margraf S., Garner L.I., Wilson T.J., Brown M.H. // *Immunology.* 2015. V. 146. № 3. P. 392–400.
- Cunningham Graham D.S., Vyse T.J., Fortin P.R., Montpetit A., Cai Y.C., Lim S., McKenzie T., Farwell L., Rhodes B., Chad L., et al. // *Genes Immunity.* 2008. V. 9. № 2. P. 93–102.
- van den Reek J.M., Coenen M.J., van de L'Isle Arias M., Zweegers J., Rodijk-Olthuis D., Schalkwijk J., Vermeulen S.H., Joosten I., van de Kerkhof P.C., Seyger M.M., et al. // *Br. J. Dermatol.* 2017. V. 176. № 5. P. 1288–1296.
- Suzuki A., Yamada R., Kochi Y., Sawada T., Okada Y., Matsuda K., Kamatani Y., Mori M., Shimane K., Hirabayashi Y., et al. // *Nat. Genet.* 2008. V. 40. № 10. P. 1224–1229.
- Furukawa H., Kawasaki A., Oka S., Shimada K., Matsui T., Ikenaka T., Hashimoto A., Okazaki Y., Takaoka H., Futami H., et al. // *Lupus.* 2013. V. 22. № 5. P. 497–503.
- Tabassum R., Mahajan A., Dwivedi O.P., Chauhan G., Spurgeon C.J., Kumar M.V., Ghosh S., Madhu S.V., Mathur S.K., Chandak G.R., et al. // *J. Hum. Genet.* 2012. V. 57. № 3. P. 184–190.
- Na S.J., Lee J.H., Kim S.W., Kim D.S., Shon E.H., Park H.J., Shin H.Y., Kim S.M., Choi Y.C. // *Yonsei Med. J.* 2014. V. 55. № 3. P. 660–668.
- Winer D.A., Winer S., Shen L., Wadia P.P., Yantha J., Paltser G., Tsui H., Wu P., Davidson M.G., Alonso M.N., et al. // *Nature Medicine.* 2011. V. 17. № 5. P. 610–617.
- Lee H.M., Kim J.J., Kim H.J., Shong M., Ku B.J., Jo E.K. // *Diabetes.* 2013. V. 62. № 1. P. 194–204.
- Brooks-Worrell B., Palmer J.P. // *Clin. Exp. Immunol.* 2012. V. 167. № 1. P. 40–46.
- Theodorakopoulou E., Yiu Z.Z., Bundy C., Chularajanamontri L., Gittins M., Jamieson L.A., Motta L., Warren R.B., Griffiths C.E. // *Br. J. Dermatol.* 2016. V. 175. № 5. P. 1038–1044.
- Donath M.Y., Shoelson S.E. // *Nat. Rev. Immunol.* 2011. V. 11. № 2. P. 98–107.
- Kaya G.A., Coskun A.N., Yilmaz V., Oflazer P., Gulsen-Parman Y., Aysal F., Disci R., Direskeneli H., Marx A., Deymeer F., et al. // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 8. P. e104760.
- Ramanujam R., Zhao Y., Pirskanen R., Hammarstrom L. // *BMC Med. Genet.* 2010. V. 11. P. 147.
- Richman D.P., Gomez C.M., Berman P.W., Burres S.A., Fitch F.W., Arnason B.G. // *Nature.* 1980. V. 286. № 5774. P. 738–739.
- Shigemoto K., Kubo S., Maruyama N., Hato N., Yamada H., Jie C., Kobayashi N., Mominoki K., Abe Y., Ueda N., et al. // *J. Clin. Invest.* 2006. V. 116. № 4. P. 1016–1024.
- Gajra A., Vajpayee N., Grethlein S.J. // *Am. J. Hematol.* 2004. V. 77. № 2. P. 196–197.
- Gregersen P.K., Kosoy R., Lee A.T., Lamb J., Sussman J., McKee D., Simpfendorfer K.R., Pirskanen-Matell R., Piehl F., Pan-Hammarstrom Q., et al. // *Ann. Neurol.* 2012. V. 72. № 6. P. 927–935.
- van der Vliet H.J., von Blomberg B.M., Nishi N., Reijm M., Voskuyl A.E., van Bodegraven A.A., Polman C.H., Rustemeyer T., Lips P., van den Eertwegh A.J., et al. // *Clin. Immunol.* 2001. V. 100. № 2. P. 144–148.
- Jordan M.A., Fletcher J.M., Jose R., Chowdhury S., Gerlach N., Allison J., Baxter A.G. // *J. Immunol.* 2011. V. 186. № 7. P. 3953–3965.
- Schwartz A.M., Putlyaeva L.V., Covich M., Klepikova A.V., Akulich K.A., Vorontsov I.E., Korneev K.V., Dmitriev S.E., Polanovsky O.L., Sidorenko S.P., et al. // *Biochim. Biophys.*

- Acta. 2016. V. 1859. № 10. P. 1259–1268.
36. Rosenbloom K.R., Armstrong J., Barber G.P., Casper J., Clawson H., Diekhans M., Dreszer T.R., Fujita P.A., Guruvadoo L., Haeussler M., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2015. V. 43. Database issue. P. D670–681.
37. Creighton M.P., Cheng A.W., Welstead G.G., Kooistra T., Carey B.W., Steine E.J., Hanna J., Lodato M.A., Frampton G.M., Sharp P.A., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. № 50. P. 21931–21936.
38. Thurman R.E., Rynes E., Humbert R., Vierstra J., Maurano M.T., Haugen E., Sheffield N.C., Stergachis A.B., Wang H., Vernot B., et al. // *Nature.* 2012. V. 489. № 7414. P. 75–82.
39. Smith E., Shilatifard A. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2014. V. 21. № 3. P. 210–219.
40. Kulakovskiy I.V., Vorontsov I.E., Yevshin I.S., Soboleva A.V., Kasianov A.S., Ashoor H., Ba-Alawi W., Bajic V.B., Medvedeva Y.A., Kolpakov F.A., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2016. V. 44. № D1. P. D116–125.
41. Vorontsov E., Kulakovskiy I., Khimulya G., Nikolaeva D., Makeev V // *BIOINFORMATICS 2015. V. 1. International Conference on Bioinformatics Models, Methods and Algorithms (BIOSTEC 2015).* P. 102–108.
42. Wingender E., Schoeps T., Donitz J. // *Nucl. Acids Res.* 2013. V. 41. Database issue. P. D165–D170.