

УДК 577.21, 575.224.22, 616.711-002

Ассоциация аллельного варианта гена аминокептидазы ERAP1 с риском развития анкилозирующего спондилита

И. В. Звягин^{1*#}, В. Ю. Дородных^{1#}, И. З. Мамедов¹, Д. Б. Староверов¹, А. Г. Бочкова²,
Д. В. Ребриков^{3,4}, Ю. Б. Лебедев¹

¹ 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

² Институт ревматологии РАМН, Москва

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

⁴ 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 аминокептидазы 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 аминокептидаза 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 презенторируемых 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 некоплементарный 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 χ^2 с учетом поправки Йейтса. Величину фактора риска (OR) и доверительный интервал (CI95%) рассчитывали с помощью on-line-калькулятора (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-

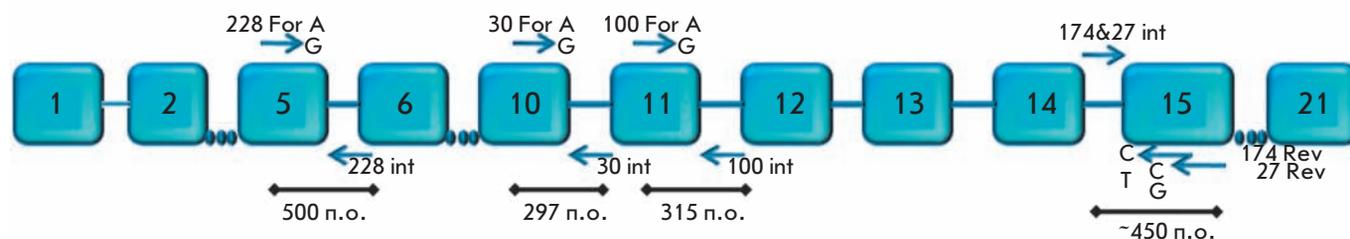


Рис. 1. Схема расположения праймеров для определения аллельных вариантов гена *erap1*. Показаны: экзоны и интроны гена *erap1*, номера экзонов, названия праймеров, длины получаемых продуктов ПЦР в п.о.

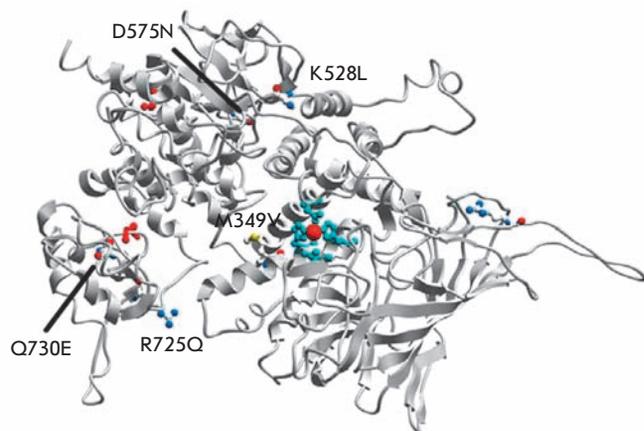


Рис. 2. Предполагаемая трехмерная структура белка ERAP1, смоделированная на основе структурной гомологии (по [11] с изменениями). Указаны положения аминокислотных замен, связанных с маркерами, по которым в настоящей работе определяли аллельные варианты гена *erap1* (синие сферы). Активный центр молекулы 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	
ССССТ	70 (0.51)
ГССТТ	36 (0.26)
GCCCT	8 (0.06)
СССТТ	7 (0.05)
GTTGT	7 (0.05)
СТТС	2 (0.01)
rs17482078/10050860/2287987	
ССТ	121 (0.88)
ТТТ	7 (0.05)
ТТС	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 рисковых гаплотипах 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 рисковых гаплотипов. Причем два рисковых 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 аминокислотной пептидазы 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.