УДК 577.112.856:612.017:616-078

# МОДИФИКАЦИЯ МЕТОДА ТИПИРОВАНИЯ ГЕНА АПОЛИПОПРОТЕИНА Е ЧЕЛОВЕКА

Е.Е.Паленка, А.К.Почерняев, Н.В.Литвиненко

Высшее государственное учебное заведение Украины

«Украинская медицинская стоматологическая академия», г.Полтава

Предложена модификация метода типирования гена аполипопротеина Е человека описанного Hixson J.E. и Vernier D.T. Проведенный анализ полной нуклеотидной последовательности гена аполипопротеина Е (NG 007084) и нуклеотидных последовательностей SNP rs429358 и rs7412 определил семь несовпадающих нуклеотидов в структуре олигонуклеотидного праймера F4 и четыре праймера F6. Несмотря на невозможность проведение ПЦР амплификации с использованием олигонуклеотидных праймеров описанных Hixson J.E. и Vernier D.T. метод был многократно повторен с опубликованием результатов рядом авторов. Для устранения этого несоответствия была разработана структура олигонуклеотидных праймеров которая позволила получать специфические продукты амплификации и проводить типирование гена *apoE* с использованием эндонуклеазы *Hha* I.

***Ключевые слова:*** *аполипопротеин Е, APOE, ген аполипопротеина Е, apoE, rs429358, rs7412, аллели ε1, ε2, ε3, ε4, изоформы Е2, Е3, Е4.*

## Modification of the method of typing of the human apolipoprotein E gene

EE Palenka, AK Pochernyaev, NV Lytvynenko

Higher State Educational Institution of Ukraine « Ukrainian Medical Stomatological Academy», Poltava, Ukraine

A modification of the method of typing of human apolipoprotein E gene described by Hixson JE and Vernier DT. The analysis of the complete sequence of the

apolipoprotein E (NG 007 084) and the nucleotide sequences of SNP rs429358 and rs7412 identified six nucleotide mismatches in the structure of the forward primer and reverse seven. Despite the impossibility of carrying out PCR amplification using oligonucleotide primers described Hixson JE and Vernier DT method was repeated several times with the publication of the results of several authors. To resolve this discrepancy was designed structure of oligonucleotide primers which give specific amplification products and carry out genotyping using endonuclease *Hha* I.

***Keywords****: apolipoprotein E, APOE, apolipoprotein E gene, apoE, rs429358, rs7412, alleles ε1, ε2, ε3, ε4, isoforms E2, E3, E4.*

## ВВЕДЕНИЕ

Аполипопротеин Е (APOE) входит в состав липопротеинов низкой плотности (ЛПОНП), промежуточной плотности (ЛППП) и высокой плотности (ЛПВП). В остаточных компонентов хиломикронов обеспечивает связывание всех этих липопротеидов с апопротеин-В,Е-рецептором. APOE участвует также в транспорте холестерина. Наиболее высокое содержание APOE – 13% от общего содержания белка отмечается в ЛПОНП. Он найден также в липопротеинах, образующихся в тонком кишечнике в процессе всасывания экзогенных липидов – остаточных компонентов хиломикронов. APOE человека представляет собой полипептид из 299 аминокислотных остатков, молекулярная масса которого составляет 34200 дальтон [13]. Ген аполипопротеина Е (*apoE*) локализован на 19-й хромосоме, его размер составляет 37 000 нуклеотидов в своей стуктуре содержит четыре экзона [6]. Ген *apoE* имеет три мажорные аллели: ε2, ε3 и ε4, кодирующие три изоформы Е2, Е3 и Е4. Эти изоформы различаются по сродству к апопротеин-В,Е-рецептору и аминокислотному составу в полиморфных участках Е2 – Arg/Arg, Е3 – Arg/Cys и Е4 – Cys/Cys.

Полное отсутствие апопротеина Е приводит к накоплению ЛППП и остаточных компонентов хиломикронов, что приводит к развитию

атеросклероза в молодом возрасте. APOE является одним из ключевых белков метаболизма липопротеинов и холестерола и участвует в образовании и секреции липопротеинов [4]. Кроме того, предполагается, что он участвует в клеточном росте и дифференцировке, а также в репарации и регенерации поврежденных тканей [14]. В центральной нервной системе *apo*E экспрессируется в астроцитах и обнаружен в спинномозговой жидкости, а также является одним из компонентов сенильных бляшек и нейрофибриллярных клубков, которые образуются при болезни Альцгеймера. Показано, что активность APOE зависит от аллельного состояния его гена [5].

Аллельные варианты ε2, ε3 и ε4 гена *apoE* характеризуется различными комбинациями двух однонуклеотидных замен цитозиновых оснований на тиминовые в позициях NG 007084: g.(3932C>T) и NG 007084: g.(4070C>T) или как чаще встречается в литературе в триплетах 112 и 158. Эти несинономические замены приводят к тому, что в полипептидной цепи происходят замена Cys > Arg.

Исследования девяти популяций (Тироль, Судан, Индия, Китай, Япония, Венгрия, Исландия, Финляндия, и Малазия) выявили значительную гетерогенность, между ними в частотах аллелей гена *apoE* и средним уровнем холестерина в крови. Основные фенотипы APOE для всех групп населения были: фенотип E3/E2 (диапазон частот от 7,0% у индийцев до 16,9% в малайцев), E3/E3 (диапазон частот от 39,8% у суданцев до 72,1% у японцев), и E3/E4 (диапазон частот от 11,3% у японцев до 35,9% у суданцев). Средние уровни холестерина в находились в диапазоне от 144,2 мг/дл в суданской до 228,5 мг/дл в исландской популяциях. Двухфакторный дисперсионный анализ влияния популяции и фенотипа APOE на уровень холестерина не показали значительной взаимосвязи, то есть, влияние фенотипа APOE на уровень холестерина существенно не отличается среди различных популяций. Эти данные указывают на то, что различные аллельные варианты гена *apoE* действуют относительно единообразно в

различных популяциях, несмотря на различия в генетическом фоне и экологических факторах [8].

Способ одновременного исследования участка гена *apoE* на которой находятся два однонуклеотидных полиморфизмы был предложен Hixson J.E. и Vernier D.T. в 1990 году [9]. Благодаря сходству нуклеотидных полиморфизмов (GCGC) в позициях триплетов 112C>T и 158C>T авторы разработали способ определения аллельных вариантов ε2, ε3 и ε4, который предусматривал рестриктний анализ *Hha* I (GCG↓C) выбранного участка гена *apoE* предварительно амплифицированного с помощью полимеразной цепной реакции. Для амплификации фрагмента гена *apoE* размером 244 пар нуклеотидов (п.н.) были использованы олигонуклеотидные праймеры предложенные [7]. Впоследствии эти два однонуклеотидные полиморфизмы были занесены в базу SNP под номерами rs429358 и rs7412.

В настоящее время, способ исследования участка гена *apoE* предложенный Hixson J.E. и Vernier D.T. широко используется как в исследовательских работах, так и в клинической диагностике. Например, подобный подход был повторен с опубликованием результатов исследований рядом авторов [1, 2, 3].

Попытка воспроизвести способ исследования гена *apoE* предложенного Hixson JE и Vernier DT [9] определила отсутствие специфической амплификации в полимеразной цепной реакции с использованием олигонуклеотидных праймеров F4 и F6 описанных во всех вышеупомянутых публикациях. Таким образом, целью данной работы была модификация метода определения аллельных вариантов ε2, ε3 и ε4 гена *apoE* человека.

**Материалы и методы исследования**

ДНК выделяли из крови стабилизированной ЕДТА с использованием ионообменной смолы Chelex-100 [16].

Типирование полиморфных кодонов 112C>T и 158C>T гена *apoE* выполняли методом ПЦР-ПДРФ. Для анализа был использован

модифицированный способ Hixson J.E. и Vernier D.T. 1990. Модификация состояла в разработке олигонклеотидних праймеров полностью гомологичных нуклеотидной последовательности гена *apoE*.

Выравнивание нуклеотидной последовательности гена *apoE* (NG_007084) и нуклеотидной последовательности праймеров проводили с использованием программы MEGA 4.0. [15].

Структура олигонуклеотидных праймеров полностью гомологичных нуклеотидной последовательности гена *apoE* подобрана с помощью программы FastPCR [10]. Олигонуклеотидные праймеры следующей структуры APOE2F – 5' ACGCGGGCACGGCTGTCCAAGGA 3' (прямой) и APOE2R – 5' TCGCGGGCCCCGGCCTGGTACA 3' (обратный), были синтезированы (Metabion GmbH, Германия). Амплификацию с помощью полимеразной цепной реакции выполняли с использованием реагентов (MBI Fermentas, Литва) на амплификаторе «Терцик» (ДНК-технология, Россия). Электрофоретическое разделения амплифицированных фрагментов ДНК гена *apoE* проводили в 2% агарозном геле в трисборатном буфере (1×TBE). Рестрикцию эндонуклеазой *Hha* I (GCG↓C) выполняли с использованием реагентов (MBI Fermentas, Литва). Электрофоретическое разделения фрагментов ДНК гена *apoE* проводили в 8% полиакриламидном геле в течение 2 часов при силе тока 50 мА. в трисборатном буфере (1×TBE). Размеры фрагментов ДНК определяли с использованием маркеров молекулярной массы GeneRuler 50bp DNA Ladder и ДНК *pUC*19/*Msp* I (MBI Fermentas, Литва). По окончании электрофореза гель окрашивали раствором бромистого этидия и документировали с помощью цифровой камеры.

**Результаты исследования и обсуждения**

Анализ нуклеотидной последовательности гена *apoE* (NG_007084, 10612 bp., DNA linear, PRI 18-FEB-2014, *Homo sapiens* apolipoprotein E) определил невозможность ПЦР амплификации с использованием описанных олигонуклеотидных праймеров. Структура праймера F6 имела четыре несовпадающих нуклеотидов из 25, а праймера F4 семь из 26 рис. 1. С

подобными трудностью, связанной с несовпадающей структурой олигонуклеотидых праймеров F4 и F6 и первичной последовательностью гена *apoE,* столкнулись и другие авторы [12].

Подобранная нами структура пары олигонуклеотидных праймеров позволила получать специфические продукты амплификации размером 227 п.н. рис.2.

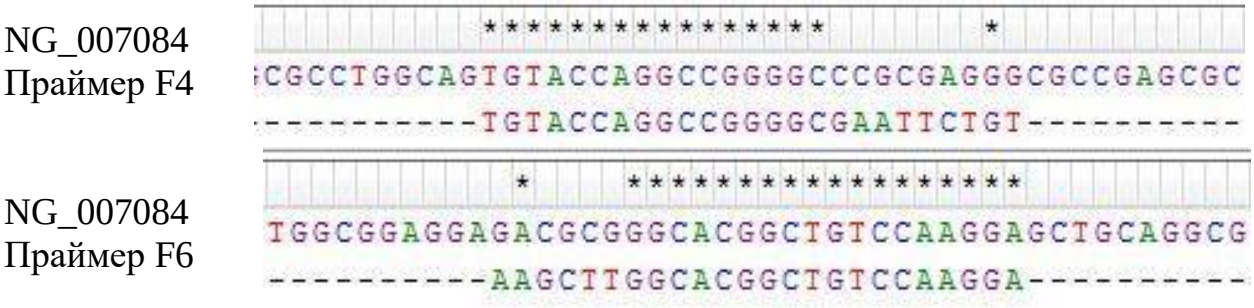


Рисунок 1. Выравнивание нуклеотидной последовательности гена *apoE* (NG_007084) и нуклеотидной последовательности праймеров F4 и F6.

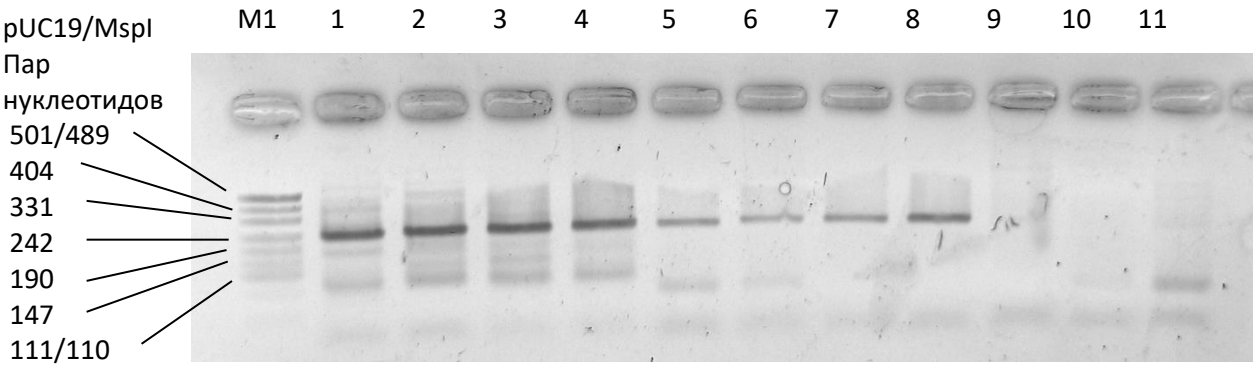


Рисунок. 2. Электрофоретическое разделения амплифицированных фрагментов ДНК гена *apoE* человека в 2% агарозном геле. М1 – ДНК *pUC*19/*Msp* I, 1, 2, 3, 4 – продукты амплификации гена *apoE* (температура отжига олигонуклеотидных праймеров 58˚С; 5,6,7,8 – 60˚С; 9,10,11,12 – 63˚С.

Комбинации трех аллелей гена *apoE* (ε2, ε3 и ε4) детерминирует шесть фенотипов APOE (E2/E2, E3/E3, E4/E4, E2/E3, E2/E4, E3/E4). Эта генетическая вариабельность возникла в результате однонуклеотидных замен в двух сайтах ДНК, кодирующих аминокислотные остатки APOE 112 и 158.

Кроме трех аллелей гена *apoE* (ε2, ε3 и ε4), был обнаружен редко встречающийся аллельный вариант *apoE* (ε1). Он возник в результате

однонуклеотидных замен в триплете 127, что было подтверждено наличием сайта рестрикции *Taq* I в этом аллельном варианте гена *apoE*. [11].

В наших исследованиях были обнаружены и определены только все мажорные аллельные варианты ε2 (91,78 п.н.), ε3 (91,48,30 п.н.) и ε4 (72,48,30) рис.3. Таким образом, было продемонстрировано возможность корректного типирования гена *apoE* с использованием предложенных нами олигонуклеотидных праймеров.

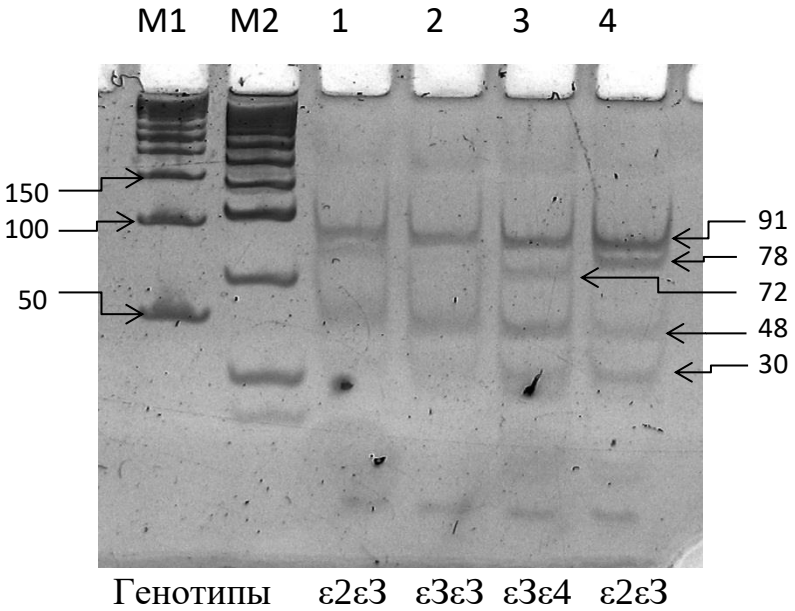


Рисунок. 3. Электрофоретическое разделения фрагментов ДНК гена *apoE* человека в 8% полиакриламидном геле. M1 – GeneRuler 50bp DNA Ladder, M2 – ДНК *pUC*19/*Msp* I, 1 – аллели ε2 (91,78 п.н.) и ε3 (91,48,30 п.н.), 2 – аллель ε3 (91,48,30 п.н.), 3 – аллели ε3 (91,48,30 п.н.) и ε4 (72,48,30), 4 – аллели ε2 (91,78 п.н.) и ε3 (91,48,30 п.н.).

**Список использованной литературы**

1. Воевода М. И и др.: Полиморфизм гена APOE и ишемический инсульт в городской популяции Западной Сибири. Бюллетень СО РАМН 2010; 30(3): 119-123.

2. Семёнова Н. А и др.: Функциональная значимость полиморфизма генов ApoE и SOD2 в формировании хронической HCV-инфекции. Бюллетень сибирской медицины 2009; (3): 64-69.

3. Chaaba R и др.: Полиморфизм гена аполипопротеина Е и активность белка-переносчика эфиров холестерина в плазме крови больных сахарным диабетом типа 2. Молекулярная биология 2008; 42(6): 931–936.

4. Beisiegel U et al.: The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein. Nature 1989; 341(6238):162-164.

5. Corder EH et al.: Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. Science 1993; 261(5123): 921-923.

6. Das H et al.: Isolation, characterization, and mapping to chromosome 19 of the human apolipoprotein E gene. J Biol Chem 1985; (260): 6240-6247.

7. Emi M et al.: Genotyping and sequence analysis of apolipoprotein E isoforms. Genomics 1988; (3): 373-379.

8. Hallman DM et al.: The apolipoprotein E polymorphism: a comparison of allele frequencies and effects in nine populations. Am J Hum Genet 1991; 49(2): 338–349.

9. Hixson JE, Vernier DT: Restriction isotyping of human apelipoprotein E by gene amplification and cleavage with Hha I. Arteriosclerosis 1990; (31): 545-548.

10. Kalendar R et al.: FastPCR Software for PCR Primer and Probe Design and Repeat Search. Genes, Genomes and Genomics 2009; 3(1): 1-14.

11. Kontula K et al.: Apolipoprotein E Polymorphism Determined by Restriction Enzyme Analysis of DNA Amplified by Polymerase Chain Reaction: Convenient Alternative to Phenotyping by Isoelectric Focusing. Clin Chem 1990; 36(12): 2087-2092.

12. Merheb G et al.: Efficient mispriming during apolipoprotein E genotyping. J Bras Patol Med Lab 2005; 41(1): 25-28.

13. Rall SCJr, Weisgraber KH, Mahley RW: Human apolipoprotein E. The complete amino acid sequence. J Biol Chem 1982; 257(8): 4171-4178.

14. Rebeck GW, Reiter JS, Strickland DK, Hyman BT: Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions. Neuron 1993;11(4):575-580.

15. Tamura K, Dudley J, Nei M, et al.: MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution 2007; (24): 1596-1599.

16. Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex 100 as a medium for extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. BioTechniques 1991; 10: 506-513.