

Репликативный анализ полиморфных локусов генов ассоциированных с остеоартрозом по результатам полногеномных исследований

Д. А. Шаповалова^{1*}, А. В. Тюрин², Р. И. Хусаинова¹

¹Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН

Россия, Республика Башкортостан, 450045 г. Уфа, проспект Октября, 71.

²Башкирский государственный медицинский университет

Россия, Республика Башкортостан, 450000 г. Уфа, улица Ленина, 3.

*Email: daria-ufa92@mail.ru

Остеоартроз (ОА) многофакторное заболевание, в основе которого лежит поражение всех компонентов сустава. Одним из факторов, предрасполагающих к развитию ОА, вероятно, является недифференцированная дисплазия соединительной ткани (нДСТ), в основе которой лежат дефекты синтеза или катаболизма компонентов внеклеточного матрикса. Нами проведен анализ полиморфных локусов в генах *CHST11*, *DVWA*, *ASTN2*, *MCF2L*, *GLT8D1*, *DOT1L* у 156 женщин с ОА и 161 контроля из Республики Башкортостан, и выявлена значимость полиморфных локусов *rs835787* (*CHST11*), *rs4836732* (*ASTN2*), *rs7639618* (*DVWA*), *rs2302061* (*DOT1L*), в формировании предрасположенности к ОА в целом, а также с учетом наличия признаков нДСТ, возраста дебюта заболевания, и локализации патологического процесса.

Ключевые слова: остеоартроз, остеоартрит, полиморфизм, полногеномные исследования, гены предрасположенности, GWAS.

Введение. Остеоартроз (ОА) (МКБ-10:М15-М19, остеоартрит в международной классификации) – полигенное, многофакторное заболевание, в основе которого лежит поражение всех компонентов сустава [1]. Данное заболевание является одной из основных причин хронической боли и инвалидности населения в мире [2]. Распространенность ОА в России на 2018 год составляет 13%, при этом заболевание чаще встречается у женщин и по сравнению с официальной статистикой Минздрава на 2010 год (3.6%), уровень заболеваемости повысился почти в 5 раз [3]. Одним из факторов, предрасполагающих к развитию ОА, вероятно, является недифференцированная дисплазия соединительной ткани (нДСТ), в основе которой лежат дефекты синтеза или катаболизма компонентов внеклеточного матрикса, регуляторов морфогенеза соединительной ткани [4], что предполагает существование общих патогенетических звеньев формирования данных патологий.

Вклад генетического компонента в развитие ОА оценивается от 40% до 65% [5], и благодаря технологии полногеномного анализа ассоциаций (GWAS) на сегодня иденти-

фицирован 21 полиморфный локус вблизи генов, ассоциированных с ОА в европейских и азиатских популяциях, вклад которых варьируется в зависимости от тяжести заболевания, локализации патологического процесса, этнического фактора и эпигенетики [6]. Несмотря на полученные ассоциации данных локусов с ОА на выборках европейских и азиатских популяций, остается открытым вопрос о прогностической значимости полученных ассоциаций для лиц с ОА, проживающих в Республике Башкортостан, а так же их значимости в проявлении признаков недифференцированной дисплазии соединительной ткани, как в сочетании с ОА так и в изолированном состоянии.

Нами проведен репликативный анализ 5 локусов, которые наиболее значимо были ассоциированы с ОА по результатам GWAS, среди которых *rs4836732* (с.512–16916G>A) гена астротактина-2 (*ASTN2*), продукт которого регулирует поверхностные уровни молекул адгезии нейронов во время миграции нейробластов [7]. Поскольку было обнаружено, что форма проксимального отдела бедра связана с восприимчивостью к ОА, исследователи предположили, что доля генетической восприимчивости к ОА может быть обусловлена генетическими вариантами, которые ассоциированы с определенным фенотипом кости, в связи с чем, роль данного локуса *rs4836732* изучалась с использованием рентгенографических моделей различной морфологии проксимального отдела бедренной кости и была обнаружена связь данного локуса с определенным фенотипом головки бедренной кости у женщин [8]. Помимо данного варианта нами были исследованы полиморфизмы: *rs11842874* (с.273–5076A>G) расположенный в 4 интроне гена (*MCF2L*), продукт которого регулирует миграцию нейротропина-3 (фактора роста нервов); полиморфизм *rs7639618* (н.1282G>A, Cys260Tyr) в гене фактора фон виллебранда, который высоко экспрессируется в хрящевой ткани [9], и влияет на прочность взаимодействия между белком *DVWA* и β -тубулином, что имеет важное значение в регуляции дифференцировки хондроцитов, и защите суставов от разрушения [10]; *rs835487* (с.204+64998A>G) гена (*CHST11*), продукт которого (карбогидрат-сульфотрансфераза), посттрансляционно модифицирует протеогликан до его выхода во внеклеточный матрикс хряща [11], и *rs6976* (с.*57G>A) гена гликозилтрансферазы-8 (*GLT8D1*), изменения в экспрессии которого могут влиять на гликозилирование хрящевых белков [12].

Так же нами исследован полиморфизм *rs2302061* (с.4252G>C, p.Val1418Leu), гена гистоновой метилтрансферазы (*DOT1L*), сцепленный с другим локусом *rs12982744* ($r^2=0.084$; $D'=1$) гена *DOT1L*, ассоциированным с ОА по результатам GWAS ($p=7.8 \times 10^{-9}$, OR=1.17; 95% ДИ 1.11–1.23) [13, 14]. Недостаточность фермента *DOT1L* нарушает молекулярный профиль здоровых хондроцитов *in vitro* и вызывает остеоартрит [15], однако необходимы дальнейшие функциональные исследования данного гена для подтверждения его роли в суставном хряще [16].

Целью исследования является оценка роли полиморфных вариантов *rs835787 (CHST11)*, *rs4836732 (ASTN2)*, *rs7639618 (DVWA)*, *rs11842874 (MCF2L)*, *rs6976 (GLT8D1)*, *rs2302061 (DOT1L)*, в формировании предрасположенности к ОА у женщин из Республики Башкортостан с учетом локализации патологического процесса, возраста дебюта заболевания и наличия признаков нДСТ, как в коморбидном так и в изолированном с ОА состояниях.

Материалы и методы. Выборка состояла из 317 женщин (средний возраст 50.3 ± 5.73), среди которых 156 женщин с остеоартрозом и 161 женщина без наличия признаков ОА. Признаки нДСТ оценивались в баллах, согласно критериям Кадуриной (2007) [17], и диагностированы у 151 женщины, в группе сравнения 166 человек без наличия таких признаков. ДНК выделяли из периферической крови методом фенольно-хлороформной экстракции. Анализ локусов *rs4836732 (ASTN2)*, *rs7639618 (DVWA)*, *rs11842874 (MCF2L)*, *rs6976 (GLT8D1)*, *rs2302061 (DOT1L)*, проведен с использованием технологии KASP®, *rs835787* гена *CHS11* – с применением «Real time – ПЦР» метода на основе TaqMan® технологии.

Результаты и обсуждение. По результатам исследования 6 полиморфных локусов, нами был получен ряд ассоциаций.

Локус *rs4836732* локализованный в 18 интроне гена *ASTN2* (астротактин 2), минорный аллель *C которого был ассоциирован с тотальной заменой тазобедренного сустава у европейских женщин ($p=6.1 \times 10^{-10}$, OR=1.13; ДИ 1.2–1.27) [12], показал ассоциацию генотипа *CC с ОА в целом (0.206) ($\chi^2=5.064$, $p=0.024$, OR=2.78; 95% ДИ (1.11–6.97)), и с ОА ранней манифестации (0.333) ($\chi^2=5.357$, $p=0.004$, OR=5.35; 95% ДИ 1.53–18.68) и ПОА (0.318) ($\chi^2=8.071$, $p=0.004$, OR=5; 95% ДИ 1.52–16.35). Также была обнаружена тенденция к ассоциации данного полиморфизма с остеоартрозом тазобедренного сустава (кок-сартрозом) (0.208) ($\chi^2=2.796$, $p=0.094$), по сравнению с группой контроля (0.085), что согласуется с полногеномными данными.

Аллель *T (0.256), а также сумма генотипов *TT (0.090) и *CT (0.333) полиморфного локуса *rs7639618* гена фактора фон Виллебранда (*DVWA*), показали ассоциацию с ОА позднего начала ($\chi^2=5.21$, $p=0.022$, OR=1.88; 95% ДИ 1.09–3.24) и ($\chi^2=6.167$, $p=0.013$, OR=2.304; 95% ДИ 1.18–4.48), по сравнению с контролем (0.155) и (0.069 и 0.172). Генотип *CT (0.529) того же полиморфного локуса *rs7639618* оказался ассоциирован с ОА ранней манифестации ($\chi^2=10.210$, $p=0.001$, OR=5.4; ДИ 1.79–16.27), в сравнении с контролем (0.172). В исследовании Miyamoto et al, (2008) минорный аллель *G данного локуса показал ассоциацию с ОА коленного сустава (гонартрозом) в когортах Японии, а также по результатам репликативных исследований китайской когорты Хань ($p=7.3 \times 10^{-11}$, OR=1.43; ДИ 1.28–1.59) [7], что частично согласуется с нашими данными.

Генотип **TT* (0.676) полиморфного локуса *rs835487* локализованный во 2 интроне, в районе энхансерной активности гена *CHST11* [11] был статистически значимо ассоциирован с остеоартрозом тазобедренного сустава (коксартрозом) ($\chi^2=6.284$, $p=0.012$, OR=2.57; 95% ДИ 1.21–5.48), а также показал тенденцию к ассоциации с ОА в целом (0.545) ($\chi^2=3.023$, $p=0.080$), по сравнению с контролем (0.447). По результатам полногеномного анализа напротив аллель **G*, был значимо ассоциирован с тотальной заменой тазобедренного сустава в европейских популяциях ($p=1.64 \times 10^{-8}$, OR=1.13; ДИ 1.09–1.18) [7], [12], что частично согласуется с нашими данными.

При изучении полиморфного локуса *rs2302061*, гена *DOT1L* получена ассоциация аллеля **C* (0.212) ($\chi^2=4.558$, $p=0.032$, OR=2.04; 95% ДИ 1.05–3.95) и его гомозиготного генотипа **CC* (0.115) ($\chi^2=6.398$, $p=0.01$, OR=22.3; 95% ДИ 1.22–408.21) с гонартрозом у женщин в общей выборке, по сравнению с контролем (0.116) и (0.000), соответственно. Аллель **C* данного полиморфного локуса также, показал ассоциацию с наличием признаков нДСТ в целом (0.189), как в изолированном ($\chi^2=4.22$, $p=0.039$, OR=1.83; 95% ДИ 1.02–3.29) так и в коморбидном с ОА случаях (0.217) ($\chi^2=4.441$, $p=0.035$, OR=2.08; 95% ДИ 1.04–4.16), по сравнению с контролем (0.113) и (0.117).

Также нами были изучены полиморфные локусы *rs11842874*, гена *MCF2L*, аллель **A* которого показал наиболее значимую ассоциацию с коксартрозом ($p=2.1 \times 10^{-08}$, OR=1.17; ДИ 1.11–1.23) [18], и *rs6976* (*GLT8D1*), аллель **T* которого показал ассоциацию как с коксартрозом, так и с гонартрозом ($p=7.2 \times 10^{-11}$, OR=1.12; 95% ДИ 1.08–1.16), по результатам полногеномных исследований, у лиц европейского происхождения [7], [12]. Однако, по результатам наших исследований частоты аллелей и генотипов полиморфных локусов *rs11842874* (*MCF2L*) и *rs6976* (*GLT8D1*), оказались сопоставимы в группах сравнения. Для всех исследованных локусов соблюдалось равновесие Харди-Вайнберга ($p \leq 0.05$).

Таким образом, нами выявлена значимость полиморфных вариантов *rs835787* (*CHST11*), *rs4836732* (*ASTN2*), *rs7639618* (*DVWA*), *rs2302061* (*DOT1L*), в формировании предрасположенности к ОА у женщин из Республики Башкортостан с учетом наличия признаков нДСТ, возраста дебюта заболевания и локализации патологического процесса. Полученные нами результаты вносят вклад в изучение генетических факторов остеоартроза как в изолированном, так и в коморбидном с нДСТ случаях, однако данные противоречивы и необходима дальнейшая валидация полученных результатов на независимых выборках.

Исследование проведено при поддержке гранта РФФИ (№16-04-01487_а.) и программой поддержки биоресурсных коллекций ФАНО.

Работа выполнена на оборудовании Центра коллективного пользования «Агидель» и уникальной научной установке «КОДИНК».

Литература

1. Sandell L. J. Etiology of osteoarthritis: Genetics and synovial joint development // *Nature Reviews Rheumatology*, 2012. Vol.8/ No.2. Pp. 77–89.
2. Warner S. C., Valdes A. M. The Genetics of Osteoarthritis: A Review // *J. Funct. Morphol. Kinesiol*, 2016. V.1. Pp.140–153.
3. Галушко ЕА, Насонов ЕЛ. Распространенность ревматических заболеваний в России // *Альманах клинической медицины*, 2018. №46 Т.1. С. 32–9.
4. Земцовский Э. В. Недифференцированные дисплазии соединительной ткани. Попытка нового осмысления концепции // *Мед. вест. Север. Кавказа*, 2008. Т.10.№2.8–14.
5. Evangelou E, Kerkhof HJ, Styrkarsdottir U, et al A meta-analysis of genome-wide association studies identifies novel variants associated with osteoarthritis of the hip // *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2014. Vol. 73. Pp. 2130–2136.
6. Warner S. C., Valdes AM. Genetic association studies in osteoarthritis: is it fairytale? // *Curr. Opin. Rheumatol.* 2017. Vol.29. №1. Pp.103–109.
7. Panoutsopoulou K., Zeggini E. Advances in osteoarthritis genetics // *J Med Genet.* 2013 Vol.50 №11. Pp. 715–24.
8. Lindner C., Thiagarajah S., Wilkinson J. M., et al. Investigation of Association Between Hip Osteoarthritis Susceptibility Loci and Radiographic Proximal Femur Shape // *Arthritis Rheumatol.* 2015. Vol.67. №8. Pp. 2076–2084.
9. Miyamoto Y., Shi D., Nakajima M., et al. Common variants in DVWA on chromosome 3p24.3 are associated with susceptibility to knee osteoarthritis // *Nature Genetics*, 2008.Vol. 40. Pp. 994–8.
10. Bravatà V., Minafra L., Forte G. I., et al. DVWA gene polymorphisms and osteoarthritis // *BMC Res Notes*, 2015. Vol.8. Pp.30.
11. Reynard L. N., Ratnayake M., Santibanez-Koref M., et al. Functional Characterization of the Osteoarthritis Susceptibility Mapping to *CHST11*—A Bioinformatics and Molecular Study // *PLoS One.* 2016. Vol.11. №7. e0159024.
12. arcOGEN Consortium, arcOGEN Collaborators. Identification of new susceptibility loci for osteoarthritis (arcOGEN): a genome-wide association study // *Lancet.* 2012. Vol. 380. Pp. 815–23.
13. Evangelou E., Valdes A. M., Castano-Betancourt M. C., et al. The DOT1L rs12982744 polymorphism is associated with osteoarthritis of the hip with genome-wide statistical significance in males // *Ann Rheum Dis.* 2013. Vol.72. №.7. Pp. 1264–5.
14. Raine E. V. A. Expression analysis of osteoarthritis susceptibility loci // *Newcastle University, PhD Thesis*, 2014. Pp.113–116.
15. Monteagudo S., Cornelis F. M. F., Aznar-Lopez C., et al. DOT1L safeguards cartilage homeostasis and protects against osteoarthritis // *Nat Commun*, 2017. Vol.19. Pp.8:15889.
16. Castaño Betancourt M. C., Cailotto F., Kerkhof H. J., et. al. Genome-wide association and functional studies identify the DOT1L gene to be involved in cartilage thickness and hip osteoarthritis // *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012. Vol.109. №21. Pp. 8218–8223.

17. Кадурина Т. И., Горбунова В. Н. Дифференцированная и недифференцированная дисплазия соединительной ткани // Дисплазия соединительной ткани: руководство для врачей. С-Пб, 2009. С. 704.
18. Day-Williams A. G., Southam L., Panoutsopoulou K., et al. A Variant in MCF2L Is Associated with Osteoarthritis // *Am J Hum Genet*, 2011. Vol.89. Pp. 446–450.

Статья рекомендована к печати лабораторией молекулярной генетики человека (докт. биол. наук, проф. заведующая лабораторией молекулярной генетики человека И. М. Хидиятова)

Replicative analysis of polymorphic loci associated with osteoarthritis based on the full genomic studies results

D. A. Shapovalova^{1*}, A. V. Tyurin², R. I. Khusainova¹

¹*Institute of Biochemistry and Genetics of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences
71 Oktyabrya Avenue, 450054 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.*

²*Bashkir State Medical University
3 Lenina Street, 450000 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.*

*Email: daria-ufa92@mail.ru

Osteoarthritis (OA) is a multifactorial disease, which is characterized by destruction of all components of joint. One of the factors predisposing to the development of OA is undifferentiated connective tissue dysplasia (uCTD), which is caused by defects in the synthesis or catabolism of extracellular matrix components. We analyzed 6 polymorphic loci of *CHST11*, *DVWA*, *ASTN2*, *MCF2L*, *GLT8D1*, *DOT1L* genes among 156 OA cases and 161 controls of women from the Republic of Bashkortostan, and associations of polymorphic loci *rs835787* (*CHST11*), *rs4836732* (*ASTN2*), *rs7639618* (*DVWA*), *rs2302061* (*DOT1L*) with OA, OA with uCTD signs, knee OA, and hip OA was revealed.

Keywords: osteoarthritis, polymorphism, full genomic investigations, genes of predisposition, GWAS.