

ГАПЛОТИПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГЕНА *HFE* В ПОПУЛЯЦИИ РУССКИХ И СРЕДИ ПАЦИЕНТОВ С МУЛЬТИФАКТОРИАЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

С.В. Михайлова¹, О.В. Онопченко², А.В. Суханов³, В.Н. Максимов³,
Т.К. Гаскина⁴, А.Г. Ромашенко¹, М.И. Воевода³

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: mikhail@bionet.nsc.ru;
² Российская медицинская академия последипломного образования, Москва, Россия; Отделение
эндокринологии областной больницы, Тамбов, Россия; ³ ГУ НИИ терапии СО РАМН,
Новосибирск, Россия; ⁴ Государственный новосибирский областной клинический
диагностический центр, Новосибирск, Россия

Ген *HFE* ассоциирован с наследственным гемохроматозом 1-го типа (НГ1) и рядом других хронических заболеваний человека. Нами было проведено генотипирование по полиморфным сайтам *C282Y*, *H63D* и *S65C* этого гена случайных выборок жителей Новосибирска, долгожителей и пациентов с хроническими диффузными заболеваниями печени, в том числе гемохроматозом и синдромом перегрузки железом, а также болезнью Альцгеймера и сахарным диабетом. В выборке НГ1 частота гомозигот *C282Y/C282Y* (около 30 %) оказалась сниженной по сравнению со средневропейской (50–100 %). Доля смешанных гетерозигот *C282Y/H63D* повышена: 15 % против 5–8 %. В выборке долгожителей не отмечено достоверного изменения частот аллелей с мутациями *C282Y* и *H63D*, это может свидетельствовать об отсутствии выраженного отбора против какого-либо из них. В выборках пациентов с НГ, болезнью Альцгеймера, сахарным диабетом и синдромом перегрузки железом повышена частота аллеля *H63D* по сравнению с популяционным контролем. Во всех контрольных выборках и выборках пациентов не было выявлено различий в частоте *S65C*. Гаплотипический анализ по интронным полиморфизмам *IVS2(+4) t/c*, *IVS4(-44) t/c* и *IVS5(-47) a/g* выявил только 4 из 8 их возможных сочетаний: TTG, TTA, СТА, ССА. Показано, что каждая из замен в кодирующей области сцеплена с определенным интронным гаплотипом: *C282Y* – с TTG, *H63D* – с СТА, *S65C* – с ССА. Это может служить доказательством монофилетического происхождения исследованных аллелей в российской популяции.

Введение

Накопление избыточного количества железа в организме происходит в различных органах, в особенности в печени, сердце, поджелудочной железе и других эндокринных железах. Гемохроматозом называют все формы избыточного накопления железа. Те из них, которые развиваются вследствие прогрессирования других заболеваний (в основном неэффективного эритропоэза) относят ко вторичным гемохроматозам. Первичный гемохроматоз был впервые описан в конце XIX в., а в 1935 г. было выдвинуто предположение о его наследственной природе. В 1976 г. было показано, что

за развитие наследственного гемохроматоза (НГ) отвечает ген, сцепленный с локусом HLA (Simon *et al.*, 1976; Beutler, 2006). После этого предпринимались многочисленные попытки локализовать ген, отвечающий за развитие заболевания, но поиски осложнялись тем фактом, что в районе расположения локуса главного комплекса гистосовместимости (МНС) относительно низка частота кроссинговеров, и анализу необходимо было подвергнуть достаточно протяженный район 6-й хромосомы. В результате позиционного клонирования и секвенирования ДНК этого локуса 6-й хромосомы в 1996 г. был идентифицирован ген, названный первоначально *HLA-H*, а позже *HFE*, а также полиморфный

сайт, который обуславливал возникновение НГ (Feder *et al.*, 1996). Было установлено, что в 80–100 % случаев пациенты с НГ имели замену *G845A (C282Y)* в гомозиготном состоянии (Merryweather-Clarke *et al.*, 2000). Кроме того, до 7,5 % таких пациентов в некоторых этнических группах являлись смешанными гетерозиготами по заменам *G845A* и *C187G (H63D)* гена *HFE* (Feder *et al.*, 1996; Datz *et al.*, 1997; Cardoso *et al.*, 1998). В последние годы было обнаружено еще несколько белков, имеющих отношение к метаболизму железа, мутации в которых приводят к развитию НГ. Клиника этих заболеваний отлична от наблюдаемой при «классическом» НГ, поэтому была введена дополнительная классификация: НГ1 (сцепленный с *HFE*), НГ2 (сцепленный с *HJV*), НГ3 (сцепленный с *TfR2*) и НГ4 (сцепленный с *Fpn*) (Beutler, 2006). Белок *HFE* относится к МНС Ib типа. Основным структурным отличием белков МНС I является гетеродимерная структура, формируемая за счет нековалентного связывания Ig-подобного домена тяжелой цепи (например, *HFE*) с β 2-микроглобулином (β 2M). Ген *HFE* имеет по разным оценкам длину 12146–13658 нп (Feder *et al.*, 1996; Sanchez *et al.*, 2001). Он состоит из 7 экзонов, 6 из которых принимают участие в кодировании белка. *HFE* состоит из лидерного пептида, α 1, α 2, α 3 петель, трансмембранного и цитоплазматического доменов. Первый экзон гена *HFE* кодирует относительно небольшую 5'-нетранслируемую область и лидерный пептид (75 н.п.) (Muga *et al.*, 2004). Два последующих экзона содержат информацию об α 1- и α 2-доменах белка. У других белков МНС I они ответственны за презентацию антигенов, но у *HFE* их стерическое расположение не допускает такого взаимодействия. 4-й экзон кодирует иммуноглобулинподобный α 3-домен, с которым нековалентно связывается β 2M. 5-й экзон – трансмембранный домен, а 6-й – как и у некоторых других МНС Ib, укороченный цитоплазматический хвост (12 ак) и 3'-UTR. В 7-м экзоне расположен 3'-UTR, длина которого у различных форм мРНК может отличаться. Было установлено, что *HFE* является регулятором взаимодействия трансферринового рецептора I-го типа (TfR1) с комплексом железа и трансферрина (Gross *et al.*, 1998; Lebron *et al.*, 1998; Lieu *et al.*, 2001; Waheed *et al.*, 2002). Замена *C282Y* находится в α 3-до-

мене и полностью нарушает связывание белка с β 2M и выход его на клеточную поверхность. Замены *H63D* и менее распространенная *S65C (A193T)* находятся в α 2-домене и не влияют на связывание *HFE* с β 2M.

Особенностью НГ1 является накопление избытка железа в паренхимальных клетках (гепатоциты и др.) и недостаток железа в ретикулоэндотелиальных клетках (клетки Купфера и др.) и энтероцитах. Эритроциты (главные потребители железа), а также другие клетки организма получают его в двух формах: в комплексе с трансферрином и в низкомолекулярной форме. Железо поступает в кровотоки из ретикулоэндотелиальных клеток после реутилизации «перезрелых» эритроцитов (до 80 % поступления железа), гепатоцитов и энтероцитов. При НГ1 энтероциты сорбируют железо, несмотря на уже существующую его избыточность в паренхимальных клетках. Таким образом, налицо нарушение регуляции взаимодействий между клетками, определяющими уровень железа в организме. Это обстоятельство стимулировало поиск новых функций *HFE*, тем более что присущие ему характерные структурные домены белка МНС не участвуют во взаимодействии с TfR1.

Были проведены многочисленные эксперименты на мышах и клеточных линиях человека с целью поиска дополнительных функций *HFE*. В результате этого было показано, что *HFE* регулирует независимое от TfR1 высвобождение железа из макрофагов (Montosi *et al.*, 2000; Drakesmith *et al.*, 2002; Davies, Enns, 2004). Для этой функции замена *H63D* оказалась более значима, чем *C282Y*. Рассматривается также прямое участие *HFE* в аллоактивации определенных типов Т-клеток мыши (Rohrlich *et al.*, 2005), а также воздействие на презентацию антигенов классическими белками МНС I (de Almeida *et al.*, 2005). Существует гипотеза, согласно которой *HFE* участвует в программировании криптических клеток эпителия кишечника на определенный уровень сорбции железа (Chorney *et al.*, 2003). Кроме того, показано, что он способен связываться с трансферриновым рецептором 2-го типа (TfR2), который также является одним из регуляторов метаболизма железа в клетках (Goswami, Andrews, 2006).

Носительство замен в гене *HFE* связывают с предрасположенностью к ряду других заболеваний помимо НГ1. Клинические данные, получаемые разными исследователями, часто противоречивы, так как проявления многих заболеваний этноспецифичны, они, по-видимому, зависят от вариабельности пока не изученных генов-модификаторов (Merryweather-Clarke *et al.*, 2003; Le Gac *et al.*, 2004), от уклада жизни и пищевых привычек. Тем не менее доказано, что частота замен *C282Y* и *H63D* в гене *HFE* повышена у пациентов с диабетом 2-го типа (Kwan *et al.*, 1998; Salonen *et al.*, 2000; Moczulski *et al.*, 2001; Malecki *et al.*, 2003), причем не только за счет недиагностированного НГ1, а также у пациентов с «неклассическим» гемохроматозом (Porto *et al.*, 1998; Mura *et al.*, 1999, 2000; Holmström *et al.*, 2002), синдромом перегрузки железом (Brandhagen *et al.*, 2000) и другими хроническими заболеваниями печени (Willis *et al.*, 2000; Cauza *et al.*, 2003; Hellerbrand *et al.*, 2003; Willis *et al.*, 2005). У пациентов с болезнью Альцгеймера, при которой железо накапливается в амилоидных бляшках, отмечено снижение возраста проявления поздней формы заболевания у носителей аллеля *H63D* (Sampietro *et al.*, 2001; Combarros *et al.*, 2003; Berlin *et al.*, 2004).

В связи с тем, что мутации гена *HFE* ассоциированы с большим количеством различных заболеваний, проявляющихся у человека в среднем возрасте, встает вопрос о причинах широкого распространения «вредных» аллелей в популяциях человека. Для оценки влияния полиморфизмов этого гена на продолжительность жизни в разных странах проводилось генотипирование выборок пожилых людей и долгожителей. Полученные в результате этого данные этноспецифичны по тем же причинам, что и данные о клинических проявлениях. Ряд исследователей не выявил отличий в частотах аллелей *C282Y* и *H63D* между популяцией и долгожителями в Англии и Нидерландах (van Aken *et al.*, 2002; Willis *et al.*, 2003). Тогда как L. Bathum с коллегами в 2001 г. в популяционной выборке датчан из 1784 человек от среднего возраста до долгожителей показали, что с возрастом падает частота гетерозигот по замене *C282Y*. Параллельно оценивались ситуации, в которых носительство замен в гене *HFE* могло

бы иметь адаптивную функцию, позволяющую аллелям *C282Y* и *H63D* существовать в популяциях человека с относительно высокими частотами. Для пожилых и долгожителей США показано, что носители замены *C282Y* и/или *H63D* имеют более высокие показатели осаждения трансферрина и большее содержание железа в организме (Garry *et al.*, 1997). Было предположено, что эти замены могут играть положительную роль для людей, проживающих в железодефицитных районах, предохраняя их от железодефицитной анемии. Для подтверждения этой гипотезы несколько исследователей изучали показатели содержания железа в крови у женщин репродуктивного возраста с различными генотипами по *HFE*. Было показано, что у австрийских женщин, носителей замены *C282Y*, достоверно выше уровень гемоглобина, сывороточного железа и показатели насыщения трансферрина (Datz *et al.*, 1998). На выборке из 23681 человека европеоидной расы из разных этнических групп Европы было обнаружено, что показатели насыщения трансферрина, сывороточного ферритина и гемоглобина существенно выше у носителей замен *C282Y* и *H63D*. При этом этнические группы различаются по средним показателям этих величин и по эффекту носительства замен на них (Beutler *et al.*, 2003).

Целью настоящего исследования были оценка влияния различных генотипов гена *HFE* на предрасположенность к развитию хронических заболеваний, часто сопровождающихся нарушением метаболизма железа и на продолжительность жизни в России. Для этого проводилось генотипирование случайной выборки жителей г. Новосибирска, случайных выборок пациентов с гемохроматозом, хроническими заболеваниями печени, сахарным диабетом, болезнью Альцгеймера, а также выборки долгожителей. Кроме того, был проведен анализ связи носительства определенных аллелей гена *HFE* с показателями железа крови у женщин. Помимо этого нами была проверена гипотеза о монофилиетичности происхождения полиморфизмов *C282Y*, *H63D* и *S65C* гена *HFE*, для этого было проведено дополнительное генотипирование по трем интронным полиморфизмам *IVS2(+4) t/c*, *IVS4(-44) t/c* и *IVS5(-47) a/g* всех носителей аллелей *C282Y* и *S65C* и гомозигот по *H63D*.

Материалы и методы

Случайные выборки здоровых жителей Новосибирска (325 чел.), долгожителей (146 чел.), пациентов с хроническими заболеваниями печени (198 чел.), сахарным диабетом (148 чел.), болезнью Альцгеймера (222 чел.) генотипировали на наличие полиморфизмов *C282Y*, *H63D*, *S65C* гена *HFE*. Для 153 женщин из популяционной выборки были известны показатели насыщения трансферрина железом, для 173 – количество эритроцитов, для 143 – концентрация железа в сыворотке крови.

Структуру внутригенных гаплотипов по ранее описанным полиморфизмам *IVS2(+4) t/c*, *IVS4(-44) t/c* и *IVS5(-47) a/g* (Beutler, West, 1997) определяли у всех носителей аллелей *C282Y* и *S65C* и у гомозигот по *H63D* (122 чел.).

Для проведения генотипирования нами были разработаны методы, основанные на анализе полиморфизма длины рестрикционных фрагментов. Подбор праймеров осуществляли в соответствии с первичной структурой ДНК гена *HFE* человека Z92910 из GenBank. Условия амплификации приведены в табл. 1. Каждая тест-система содержала внутренний контроль полноты расщепления фрагмента рестриктазой для исключения возможности неоднозначного толкования результатов.

Результаты

Результаты проведенного генотипирования образцов ДНК вышеупомянутых выборок приведены в табл. 2. Частоты аллелей *C282Y*, *H63D* и *S65C* гена *HFE* в популяционной выборке русских г. Новосибирска не отличаются от описанных в литературе для ряда стран Западной Европы (Merryweather-Clarke *et al.*, 2000). Среди долгожителей не отмечено достоверного снижения частоты какого-либо из аллелей по сравнению с популяционной выборкой. У пациентов с болезнью Альцгеймера (БА) наблюдается повышенная по сравнению с популяционной выборкой и выборкой долгожителей частота аллеля *H63D* (18,5 % против 13,1 % и 12,0 %, $P < 0,05$). У пациентов с хроническими диффузными заболеваниями печени (ХДЗП) наблюдается недостоверное повышение частот аллелей *C282Y* (5 % против 3,4 %) и *H63D* (16,9 % против 13,1 %). При этом в выборке пациентов, у которых заболевание сопровождалось синдромом перегрузки железом (СПЖ), т. е. повышенными показателями сывороточного железа ($> 28,3$ мкмоль/л для мужчин, > 26 мкмоль/л для женщин) и сывороточного ферритина (> 250 мкг/л для мужчин, > 120 мкг/л для женщин), частота аллеля *H63D* составляла 21,8 % ($P < 0,05$). У пациентов с НГ повышена

Таблица 1

Условия амплификации, позиции праймеров и рестриктазы, использованные в генотипировании

Полиморфный сайт	Температура отжига	Позиции праймеров	Эндонуклеаза рестрикции	Длины продуктов рестрикции
<i>H63D</i>	55 °C	4929–4907, 4717–4743	<i>Ksp22I</i>	H 171, 21, 20 D 192, 20
<i>S65C</i>	59 °C	4719–4742, 4876–4852	<i>HinfI</i>	S 70, 49, 32 C 119, 32
<i>C282Y</i>	59 °C	6668–6688, 6953–6933	<i>RsaI</i>	C 261, 25 Y 229, 32, 25
<i>IVS2(+4) t/c</i>	52 °C	4727–4750, 4993–4971	<i>RsaI</i>	T 246, 21 C 170, 76, 21
<i>IVS4(-44) t/c</i>	59 °C	6668–6688, 6953–6933	<i>BsuRI</i>	T 213, 73 C 142, 73, 71
<i>IVS5(-47) a/g</i>	52 °C	7848–7872, 8033–8010	<i>PspN4I</i>	A 150, 36 G 100, 50, 36

Таблица 2

Частоты генотипов и аллелей гена HFE в популяционных выборках и выборках пациентов с различными хроническими заболеваниями

Выборка	n	Возраст	Число носителей генотипа							Частоты аллелей			
			C282Y/WT	C282Y/H63D	C282Y/C282Y	H63D/WT	H63D/H63D	H63D/S65C	S65C/WT	WT/WT	C282Y	H63D	S65C
Русские, Новосибирск													
Мужчины	150		11	0	0	31	4	1	4	99	0,037 ± 0,002	0,133 ± 0,020	0,017 ± 0,007
Женщины	175	43	9	2	0	36	3	1	7	117	0,031 ± 0,009	0,129 ± 0,018	0,023 ± 0,008
В целом	325		20	2	0	67	7	2	11	216	0,034 ± 0,007	0,131 ± 0,013	0,020 ± 0,005
Долгожители													
Мужчины	36		1	0	0	7	0	0	1	27	0,014 ± 0,014	0,097 ± 0,035	0,014 ± 0,014
Женщины	110	92	4	0	0	20	4	0	2	81	0,018 ± 0,009	0,127 ± 0,022	0,009 ± 0,006
В целом	146		5	0	0	27	4	0	3	108	0,017 ± 0,008	0,120 ± 0,019	0,010 ± 0,006
Болезнь Альцгеймера													
	222	69	14	3	0	69	5	0	5	126	0,038 ± 0,009	0,185 ± 0,018	0,009 ± 0,004
ХДЗП в целом													
	198	45	9	3	4	52	6	0	7	117	0,050 ± 0,011	0,169 ± 0,019	0,018 ± 0,007
Гемохроматоз	13	51	2	2	4	3	1	0	0	0	0,461 ± 0,098	0,269 ± 0,087	0
СПЖ	55	46	3	0	0	20	2	0	3	27	0,027 ± 0,015	0,218 ± 0,039	0,027 ± 0,005
Диабет в целом													
	148	54	10	0	2	40	7	0	1	88	0,047 ± 0,012	0,182 ± 0,022	0,003 ± 0,003
Тяжелые осложнения	30	56	1	0	1	5	3	0	0	20	0,075 ± 0,034	0,183 ± 0,050	0
Невыраженные осложнения	53	58	7	0	0	15	2	0	1	28	0,066 ± 0,024	0,179 ± 0,037	0,009 ± 0,009
Без осложнений	65	51	2	0	1	20	2	0	0	40	0,031 ± 0,015	0,185 ± 0,034	0

Примечание. n – размер выборки, ХДЗП – хронические диффузные заболевания печени, СПЖ – синдром перегрузки железом.

частота гомозигот *C282Y/C282Y* и смешанных гетерозигот *C282Y/H63D*. У пациентов с сахарным диабетом (СД) повышена частота *H63D*: 18,2 % против 13,1 % ($P < 0,05$). Причем в группе пациентов с тяжелыми осложнениями диабета, к которым относили выраженную нефропатию, пролиферативную ретинопатию, тяжелую нейропатию, ишемическую болезнь сердца с наличием стенокардии, перенесенный инсульт, количество носителей генотипа *H63D/H63D* в 3 раза выше ожидаемого. Большинство носителей аллеля *C282Y* попадает в группу пациентов с осложнениями СД.

Для оценки корреляции носительства генотипов, содержащих аллели *C282Y*, *H63D* и *S65C* гена *HFE*, с показателями железа крови нами была генотипирована популяционная выборка женщин Новосибирска с известными биохимическими показателями железа крови и количеством эритроцитов. Результаты приведены в табл. 3.

Обследованная выборка оказалась недостаточной по размеру для оценки влияния генотипов *HFE* на показатели железа. У носителей генотипа *C282Y/H63D*, имеющих предрасположенность к НГ1, величины сывороточного железа, НТЖ и количество эритроцитов мало отличались от таковых у носителей других обнаруженных генотипов. Это подтверждает полученные другими исследователями данные о невысокой клинической пенетрантности сложных гетерозигот по заменам *C282Y* и *H63D* (Beutler *et al.*, 2002).

С целью проверки предположения о монофилетичности происхождения замен *C282Y*,

H63D и *S65C* гена *HFE* было проведено генотипирование носителей аллелей *C282Y* и *S65C* и гомозигот *H63D/H63D* по трем широко распространенным интронным полиморфизмам *IVS2(+4) t/c*, *IVS4(-44) t/c* и *IVS5(-47) a/g*. Полученные результаты обобщены в табл. 4.

Таким образом, обнаружено только 4 из 8 возможных сочетаний интронных полиморфизмов: TTG, TTA, СТА, ССА. Видно, что каждая из замен в кодирующей области сцеплена с определенным интронным гаплотипом: *C282Y* – с TTG, *H63D* – с СТА, *S65C* – с ССА.

Обсуждение

Как упоминалось выше, НГ1 наиболее распространен на севере и в центре Западной Европы и в странах, населенных выходцами из этого региона. В большинстве случаев пациенты являются гомозиготами *C282Y/C282Y* по гену *HFE*, однако в обследованной нами выборке количество носителей этого генотипа составляет около 30 %. Вклад смешанных гетерозигот *C282Y/H63D* в формирование НГ1 в этой выборке несколько выше полученного для Европы: 15 % против 5–8 % (Datz *et al.*, 1997; Cardoso *et al.*, 1998; Merryweather-Clarke *et al.*, 2000). Это свидетельствует о более существенном вкладе других генетических и средовых факторов в формирование данного заболевания в России.

Частота аллеля *H63D* повышена в выборках пациентов с НГ, БА, СД и СПЖ. Известно,

Таблица 3

Средние показатели содержания железа и количества эритроцитов в крови в популяционной выборке женщин с различными генотипами *HFE*

Показатели содержания железа, (количество носителей)	Генотипы <i>HFE</i>						
	<i>C282Y/WT</i>	<i>C282Y/H63D</i>	<i>H63D/WT</i>	<i>H63D/H63D</i>	<i>S65C/WT</i>	<i>H63D/S65C</i>	<i>WT/WT</i>
Сывороточное железо, мкмоль/л	15,86 + 4,03 (7)	16,45 + 3,61 (2)	16,38 + 4,76 (30)	14,23 + 2,33 (3)	15,35 + 2,72 (6)	нет	15,63 + 3,53 (95)
НТЖ, %	29,55 + 9,42 (8)	30,19 + 0,50 (2)	28,92 + 10,01 (33)	21,38 + 4,23 (3)	25,27 + 7,56 (6)	нет	25,28 + 7,57 (101)
Количество эритроцитов *10 ¹² /л	3,96 + 0,37 (9)	4,63 + 0,23 (2)	4,14 + 0,34 (35)	4,17 + 0,33 (3)	4,08 + 0,38 (7)	3,72 (1)	4,19 + 0,42 (116)

Примечание. НТЖ – насыщение трансферрина железом.

Таблица 4

Избирательная сцепленность конкретных внутригенных гаплотипов по трем интронным полиморфным сайтам с аллелями гена *HFE*, содержащими одну из мажорных мутаций, *C282Y*, *H63D* и *S65C*

<i>HFE</i> генотип	Полиморфизм интронов			Гаплотип	n
	II	IV	V		
	<i>IVS2(+4)</i>	<i>IVS4(-44)</i>	<i>IVS5(-47)</i>		
<i>C282Y/C282Y</i>	T/T	T/T	G/G	TTG/TTG	4
<i>H63D/H63D</i>	C/C	T/T	A/A	CTA/CTA	29
<i>H63D/S65C</i>	C/C	T/C	A/A	CTA/CCA	2
<i>C282Y/H63D</i>	T/C	T/T	G/A	<i>TTG/CTA</i>	8
<i>C282Y/WT</i>	T/T	T/T	G/G	TTG/TTG	30
	T/C	T/T	G/A	<i>TTG/CTA</i>	10
	T/T	T/T	G/A	TTG/TTA	8
	T/C	T/C	G/A	<i>TTG/CCA</i>	5
<i>S65C/WT</i>	T/C	T/C	G/A	<i>TTG/CCA</i>	13
	T/C	T/C	A/A	<i>TTA/CCA</i>	6
	C/C	T/C	A/A	CTA/CCA	5
	C/C	C/C	A/A	CCA/CCA	2

Примечание. Жирный шрифт – однозначно определяемый гаплотип, курсив – наиболее вероятный гаплотип, n – количество носителей.

что эта замена не влияет на способность *HFE* связываться с $\beta 2M$ и не сказывается на его взаимодействии с TfR1, поэтому можно предполагать, что этот белок влияет на развитие этих заболеваний иным способом. Кроме того, возможно, что аллель *H63D* сцеплен с некоторыми вариантами других генов HLA, способными воздействовать на течение этих заболеваний, что, однако, пока не нашло экспериментального подтверждения. Анализ выборки долгожителей не позволяет говорить о достоверном изменении частот в ней по сравнению с популяционной выборкой, но очевидно, что в целом в популяции не наблюдается заметного отбора против какого-либо из проанализированных аллелей. Это может говорить о том, что, несмотря на отрицательное влияние замен в гене *HFE* на течение некоторых патологических процессов, их наличие не является однозначно отрицательным генетическим фактором, влияющим на продолжительность жизни. Существует предположение, что помимо низкой пенетрантности вышеперечисленных замен гена *HFE* в клинике большинства сцепленных

с ним заболеваний в пострепродуктивный период, в популяции имеет место также «положительная» селекция по этим вариантам. Тот факт, что у носителей генотипа *C282Y/H63D* показатели железа крови несколько выше, чем у носителей других обнаруженных генотипов, можно рассматривать как довод в пользу этого предположения. Нами не обнаружено отличий в частоте аллеля *S65C* между обследованными выборками. Это может быть объяснено как незначительностью влияния данного полиморфизма на клинику вышеназванных заболеваний, так и недостаточностью объемов выборок.

Результаты проведенного гаплотипического анализа гена *HFE* по интронным полиморфизмам *IVS2(+4) t/c*, *IVS4(-44) t/c* и *IVS5(-47) a/g* и мажорным мутациям *C282Y*, *H63D* и *S65C*, а именно сцепленность каждой из них с определенным гаплотипом по трем полиморфным сайтам, доказывают монофилетичность происхождения вышеназванных мутаций и общие корни их распространения в Западной Европе и России.

Дальнейшее расширение обследуемых выборов позволит оценить как влияние носительства различных аллелей гена *HFE* на продолжительность жизни, так и роль железа во многих патологических процессах.

Литература

- Bathum L., Christiansen L., Nybo H. *et al.* Association of the hemochromatosis gene with shorter life expectancy // *Arch. Intern. Med.* 2001. V. 161. P. 2441–2444.
- Berlin D., Chong G., Chertkow H. *et al.* Evaluation of HFE (hemochromatosis) mutations as genetic modifiers in sporadic AD and MCI // *Neurobiol. Aging.* 2004. V. 25. P. 465–474.
- Beutler E., West C. New diallelic markers in the HLA region of chromosome 6 // *Blood Cell. Mol. Dis.* 1997. V. 23. P. 219–229.
- Beutler E. Hemochromatosis: genetics and pathophysiology // *Annu. Rev. Med.* 2006. V. 57. P. 331–347.
- Beutler E., Felliti V., Gelbart T., Waalen J. Haematological effects of the C282Y HFE mutation in homozygous and heterozygous states among subjects of northern and southern European ancestry // *Br. J. Haematol.* 2003. V. 120. P. 887–893.
- Beutler E., Felitti V.J., Koziol J.A. *et al.* Penetrance of 845G→A(C282Y)HFE hereditary haemochromatosis mutation in the USA // *Lancet.* 2002. V. 359. P. 211–218.
- Brandhagen D.J., Fairbanks V.F., Baldus W.P. *et al.* Prevalence and clinical significance of HFE gene mutations in patients with iron overload // *Am. J. Gastroenterol.* 2000. V. 10. P. 2910–2914.
- Cardoso E.M., Stal P., Hagen K. *et al.* HFE mutations in patients with hereditary haemochromatosis in Sweden // *J. Intern. Med.* 1998. V. 243. P. 203–208.
- Cauza E., Peck-Radosavljevic M., Ulrich-Pur H. *et al.* Mutations of the HFE gene in patients with hepatocellular carcinoma // *Am. J. Gastroenterol.* 2003. V. 98. P. 442–447.
- Chorney M.J., Yoshida Y., Meyer P.N. *et al.* The enigmatic role of the hemochromatosis protein (HFE) in iron absorption // *Trends in Mol. Med.* 2003. V. 9. P. 118–125.
- Combarros O., Garcia-Roman M., Fontalda A. *et al.* Interaction of the H63D mutation in the hemochromatosis gene with the apolipoprotein E epsilon 4 allele modulates age at onset of Alzheimer's disease // *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 2003. V. 15. P. 151–154.
- Datz C., Haas T., Rinner H. *et al.* Heterozygosity for the C282Y mutation in the hemochromatosis gene is associated with increased serum iron, transferrin saturation, and hemoglobin in young women: a protective role against iron deficiency? // *Clin. Chem.* 1998. V. 12. P. 2429–2432.
- Datz C., Lalloz M.R., Vogel W. *et al.* Predominance of the HLA-H Cys282Tyr mutation in Austrian patients with genetic haemochromatosis // *J. Hepatol.* 1997. V. 27. P. 773–779.
- Davies P.S., Enns C.A. Expression of the hereditary hemochromatosis protein HFE increases ferritin levels by inhibiting iron export in HT29 cells // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 25085–25092.
- de Almeida S.F., Carvalho I.F., Cardoso C.S. *et al.* HFE cross-talks with the MHC class I antigen presentation pathway // *Blood.* 2005. V. 106. P. 971–977.
- Drakesmith H., Sweetland E., Schimanski L. *et al.* The hemochromatosis protein HFE inhibits iron export from macrophages // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. P. 15602–15607.
- Feder J.N., Gnirke A., Thomas W. *et al.* A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary hemochromatosis // *Nature Genet.* 1996. V. 13. P. 399–408.
- Garry P.J., Montoya G.D., Baumgartner R.N. *et al.* Impact of HLA-H mutations on iron stores in healthy elderly men and women // *Blood Cell. Mol. Dis.* 1997. V. 14. P. 277–287.
- Goswami T., Andrews N.C. Hereditary hemochromatosis protein, HFE, interaction with transferrin receptor 2 suggests a molecular mechanism for mammalian iron sensing // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. P. 28494–28498.
- Gross C.N., Irrinki A., Feder J.N., Enns C.A. Co-trafficking of HFE, a nonclassical major histocompatibility complex class I protein, with the transferrin receptor implies a role in intracellular iron regulation // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 22068–22074.
- Hellerbrand C., Poppl A., Hartmann A. *et al.* HFE C282Y heterozygosity in hepatocellular carcinoma: evidence for an increased prevalence // *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2003. V. 1. P. 2779–284.
- Holmström P., Marmur J., Eggertsen G. *et al.* Mild iron overload in patients carrying the HFE S65C gene mutation: a retrospective study in patients with suspected iron overload and healthy controls // *Gut.* 2002. V. 51. P. 723–730.
- Kwan T., Leber B., Ahuja S. *et al.* Patients with type 2 diabetes have a high frequency of the C282Y mutation of the hemochromatosis gene // *Clin. Invest. Med.* 1998. V. 21. P. 251–257.
- Lebron J.A., Bennett M.J., Vaughn D.E. *et al.* Crystal structure of the hemochromatosis protein HFE and characterization of its interaction with transferrin receptor // *Cell.* 1998. V. 93. P. 111–123.
- Le Gac G., Scotet V., Ka P.C. *et al.* The recently identified type 2A Juvenile haemochromatosis gene (HJV), a second candidate modifier of the C282Y homozygous

- phenotype // *Hum. Mol. Genet.* 2004. V. 13. P. 1913–1918.
- Lieu P.T., Heiskala M., Peterson P.A., Yang Y. The roles of iron in health and disease // *Mol. Aspects Med.* 2001. V. 22. P. 1–87.
- Malecki M.T., Klupa T., Walus M. *et al.* A search for association between hereditary hemochromatosis gene mutations and type 2 diabetes in a Polish population // *Med. Sci. Monit.* 2003. V. 9. P. 91–95.
- Merryweather-Clarke A.T., Cadet E., Bomford E. *et al.* Digenic inheritance of mutations in HAMP and HFE results in different types of haemochromatosis // *Hum. Mol. Genet.* 2003. V. 12. P. 2241–2247.
- Merryweather-Clarke A.T., Pointon J.J., Jouanolle A.N. *et al.* Geography of HFE C282Y and H63D mutations // *Genet. Test.* 2000. V. 4. P. 183–198.
- Moczulski D.K., Grzeszczak W., Gawlik B. Role of hemochromatosis C282Y and H63D mutations in HFE gene in development of type 2 diabetes and diabetic nephropathy // *Diabetes Care.* 2001. V. 24. P. 1187–1191.
- Montosi G., Paglia P., Garuti C. *et al.* Wild-type HFE protein normalizes transferrin iron accumulation in macrophages from subjects with hereditary hemochromatosis // *Blood.* 2000. V. 96. P. 1125–1129.
- Mura C., Le Gac G., Jacolot S., Férec C. Transcriptional regulation of the human HFE gene indicates high liver expression and erythropoiesis coregulation // *The FASEB J.* 2004. V. 18. P. 1922–1924.
- Mura C., Le Gac G., Raguene O. *et al.* Relation between HFE mutations and mild iron-overload expression // *Mol. Genet. Metab.* 2000. V. 69. P. 295–301.
- Mura C., Raguene O., Férec C. HFE mutations analysis in 711 hemochromatosis probands: evidence for S65C implication in mild form of hemochromatosis // *Blood.* 1999. V. 93. P. 2502–2505.
- Porto G., Alves H., Rodrigues P. *et al.* Major histocompatibility complex class I associations in iron overload: evidence for a new link between the HFE H63D mutation, HLA-A29, and non-classical forms of hemochromatosis // *Immunogenetics.* 1998. V. 47. P. 404–410.
- Rohrlich P.S., Fazilleau N., Ginhoux F. *et al.* Direct recognition by $\alpha\beta$ cytotoxic T cells of HFE, a MHC class Ib molecule without antigen-presenting function // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. P. 12855–12860.
- Salonen J.T., Tuomainen T.-P., Kontula K. Role of C282Y mutation in haemochromatosis gene in development of type 2 diabetes in healthy men: prospective cohort study // *B.M.J.* 2000. V. 320. P. 1706–1707.
- Sampietro M., Caputo L., Casatta A. *et al.* The hemochromatosis gene affects the age of onset of sporadic Alzheimer's disease // *Neurobiol. Aging.* 2001. V. 22. P. 563–568.
- Sánchez M., Bruguera M., Rodés J., Oliva R. Complete characterization of the 3' region of the human and mouse hereditary hemochromatosis HFE gene and detection of novel splicing forms // *Blood Cells Mol. Dis.* 2001. V. 27. P. 35–43.
- Simon M., Bourel R., Fauchet R., Genetet B. Association of HLA-A3 and HLA-B14 antigens with idiopathic hemochromatosis // *Gut.* 1976. V. 17. P. 332–334.
- van Aken M.O., de Craen A.J.M., Gussekloo J. *et al.* No increase in mortality and morbidity among carriers of the C282Y mutation of the hereditary hemochromatosis gene in the oldest old: the Leiden 85-plus Study // *Eur. J. Clin. Invest.* 2002. V. 32. P. 750–754.
- Waheed A., Grubb J.H., Zhou X.Y. *et al.* Regulation of transferrin-mediated iron uptake by HFE, the protein defective in hereditary hemochromatosis // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. P. 3117–3122.
- Willis G., Bardsley V., Fellows I.W. *et al.* Hepatocellular carcinoma and the penetrance of the HFE C282Y mutations: a cross sectional study // *B.M.C. Gastroenterol.* 2005. V. 5. P. 17.
- Willis G., Wimperis J.Z., Lonsdale R. *et al.* Incidence of liver disease in people with HFE mutations // *Gut.* 2000. V. 46. P. 401–404.
- Willis G., Wimperis J.Z., Smith K. *et al.* HFE mutations in the elderly // *Blood Cells. Mol. Dis.* 2003. V. 2. P. 240–246.

HAPLOTYPIC ANALYSIS FOR THE *HFE* GENE IN RUSSIAN POPULATIONS AND IN PATIENTS WITH COMMON DISEASES

**S.V. Mikhailova¹, O.V. Onopchenko², A.V. Sukhanov³, V.N. Maksimov³, T.K. Gaskina⁴,
A.G. Romaschenko¹, M.I. Voevoda³**

¹ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia, e-mail: mikhail@bionet.nsc.ru;

² Endocrinological Dep. of the Tambov Regional Hospital, Tambov, Russia;

³ Institute of Internal Diseases, SB RAMS, Novosibirsk, Russia;

⁴ Novosibirsk State Clinical Diagnostic Center, Novosibirsk, Russia

Summary

The *HFE* gene is associated with the human hereditary hemochromatosis 1 type (HH1) and a number of other chronic diseases. We carried out a genotyping for the *C282Y*, *H63D* and *S65C* polymorphic sites of this gene in random cohorts of Novosibirsk inhabitants, elderly persons and patients with chronic liver diseases, including the HH1 and an iron overload syndrome, and also Alzheimer disease (AD) and a diabetes mellitus (DM). In the HH1 samples a *C282Y/C282Y* homozygote frequency (about 30 %) is reduced in comparison with the European cohorts (50–100 %). The share of *C282Y/H63D* compound heterozygotes is increased up to 15 % against 5–8 %. In the samples of the elderly there was not statistically significant change of the *C282Y*, *H63D* and *S65C* alleles frequencies. It allowed us to suppose the absence of an essential selection against any of these alleles. In samples of patients with HH1, AD, DM and an iron overload syndrome the *H63D* allele frequency was increased in comparison with a population's control. Distinctions in *S65C* frequency in all control samples and samples of patients have not been revealed. Haplotypic analysis of the *IVS2 (+4) t/c*, *IVS4 (-44) t/c* and *IVS5 (-47) a/g* intronic polymorphisms has revealed only 4 of 8 their possible combinations: TTG, TTA, CTA, CCA. It has been shown, that each of the mutations in a coding gene region is linked with the certain intron haplotype: *C282Y* – with TTG, *H63D* – with CTA, *S65C* – with CCA. It may be a proof of the monophyletic origin of the alleles in the Russian population.