

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА ХОЛОДОВОГО РЕЦЕПТОРА *TRPM8* В ЭТНИЧЕСКИХ ГРУППАХ СИБИРИ И ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА

Т.А. Потапова¹, Н.С. Юдин¹, В.Н. Бабенко¹, И.В. Пилипенко¹, В.Ф. Кобзев¹,
Л.А. Гырголька², М.И. Воевода²

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: potapova@ngs.ru;
² ГУ НИИ терапии СО РАМН, Новосибирск, Россия

Изучена межпопуляционная гетерогенность по однонуклеотидным полиморфизмам rs28901637 (P249P) и rs11562975 (L250L) гена холодого рецептора *TRPM8* (2q31) в этнических группах Сибири и Дальнего Востока. Состав гаплотипов русских, немцев и хантов оказался наиболее гомогенным, на 85 % состоящим из одного гаплотипа. Генетические различия между русскими–немцами и русскими–хантами были статистически недостоверны. Европеоиды и ханты отличались по частоте гаплотипов от этнических групп монголоидов. Центральноеазиатские монголоиды (казахи, тувинцы, шорцы, хакасы), проживающие на смежных территориях, по частотам гаплотипов были близки, в то время как арктические (чукчи тундровые, чукчи приморские, эскимосы) различались между собой. Низкие значения коэффициента F_{st} указывали на невысокий уровень гетерогенности между монголоидами.

Ключевые слова: ген *TRPM8*, однонуклеотидный полиморфизм, гаплотипы, популяции, коэффициент F_{st} , европеоиды, монголоиды, финно-угры.

Введение

В адаптации человека к температуре внешней среды важная роль принадлежит терморепцепторам, являющимся первичным звеном термочувствительности. У человека клонированы несколько генов, кодирующих рецепторы, охватывающие широкий диапазон температур (Caterina *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2002). Терморепцепторы преимущественно являются членами TRP (transient receptor potential) – суперсемейства потенциалзависимых катионных каналов (Voets, Nilius, 2003). Холодовой рецептор TRPM8 (известный так же, как Trp-p8 или CMR1) можно активировать пониженной температурой (в диапазоне от 8 °C до 25 °C), а также химическими агентами, такими, как ицилин и ментол (McKemy *et al.*, 2002; Nilius *et al.*, 2005).

Ген холодого рецептора *TRPM8* человека размером приблизительно в 95 тыс. п.н. расположен на второй хромосоме в районе 2q37.1 (Tsavaler *et al.*, 2001). Экспрессия гена *TRPM8* зафиксирована в ядрах клеток тройничного нерва и в клетках симпатических ганглиев. В

настоящее время в базе данных dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) описано более 100 полиморфных сайтов, локализованных в разных участках гена *TRPM8*. Известны частоты некоторых полиморфизмов гена, полученные на небольших выборках европейских и восточноазиатских популяций, исследуемых в рамках проекта HapMap (<http://www.hapmap.org>). Систематический анализ распространенности полиморфизмов гена *TRPM8* в различных этнических группах не проводили.

Целью данной работы были анализ гена холодого рецептора *TRPM8* по однонуклеотидным полиморфизмам rs28901637 (P249P) и rs11562975 (L250L) и оценка межпопуляционной дивергенции этнических групп, представляющих коренное и пришлое население Сибири и Дальнего Востока.

Материалы и методы

В работе изучены популяции русских (г. Новосибирск), российских немцев (Республика Алтай), хантов (Ханты-Мансийский автоном-

ный округ), казахов (Республика Алтай), тувинцев (Республика Тыва), хакасов (Республика Хакасия), шорцев (Кемеровская область), чукчей (Чукотский автономный округ), эскимосов (Иглулик, Канада). Выборки сформированы путем случайного отбора представителей этих этнических групп.

Проанализированные однонуклеотидные полиморфизмы (ОНП) гена *TRPM8* представляли синонимичные замены нуклеотидов. Полиморфизм rs28901637 (A→T) не приводит к замене аминокислоты (пролина) в белке. Аминокислота находится в позиции 249, ОНП был обозначен как P249P. ОНП rs11562975 (G→C) не меняет лейцин на другую аминокислоту в 250-й позиции и обозначен как L250L. ДНК выделяли из крови методом фенольной экстракции (Смит и др., 1990). Анализ полиморфизмов проводили с помощью аллель-специфической ПЦР. Для подтверждения результатов генотипирования проводили секвенирование образцов на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) в Межинститутском центре секвенирования ДНК СО РАН. В табл. 1 указаны праймеры и некоторые параметры реакций.

Условия ПЦР были следующими: денатурация при 95 °С 1 мин, отжиг при 57 °С (или 60 °С) 1 мин, синтез при 72 °С 1 мин – 30 циклов. Амплификационная смесь в объеме 25 мкл содержала 75 мМ трис-НСl (рН 9,0), 20 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01 % Tween-20, 1,5 (или 2,5) мМ MgCl₂, 0,2 мМ каждого dNTP, 0,5 мкМ каждого из праймеров, 1,25 ед. Taq-полимеразы и 0,5 мкг геномной ДНК.

Продукты ПЦР оценивали электрофорезом в 4 %-м полиакриламидном геле, окрашивание

проводили бромистым этидием и визуализировали в проходящем УФ-свете.

Частоты аллелей и генотипов сравнивали с использованием критерия χ^2 . Тест на соблюдение равновесия Харди–Вайнберга проводили с помощью программы SHNHW (Zaykin, Pudovkin, 1993). Анализ гаплотипов был проведен методом максимального правдоподобия, коэффициент F_{st} рассчитан по методу Слаткина (Slatkin, 1995) с использованием программы Arlequin (<http://lgb.unige.ch/arlequin>).

Результаты и обсуждение

Распределение частот генотипов по полиморфизму P249P во всех изученных популяциях соответствовало равновесию Харди–Вайнберга (табл. 2). Несоответствие равновесию обнаружено по локусу L250L у хантов и эскимосов вследствие превышения частот гомозигот по С-аллелю.

Результаты генотипирования показали, что полиморфизм P249P отсутствовал у немцев и редко встречался у русских (0,027 Т-аллель). Частоты С-аллеля L250L ОНП в этих популяциях имели близкие значения 0,097 (русские) и 0,099 (немцы). Ханты, относящиеся к финно-угорской группе и имеющие промежуточные антропологические характеристики между европеоидами и монголоидами, по частоте L250L (0,059) были близки к европеоидам, а по P249P (0,078) проявили сходство с монголоидами.

Среди центральноазиатских монголоидов близкие частоты L250L обнаружены у казахов с тувинцами (0,207 и 0,231 соответственно) и у хакасов с шорцами (0,301 и 0,325 соответственно). Полиморфизм P249P с наибольшей частотой встречался у казахов (0,185). Тувинцы

Таблица 1

Характеристика ПЦР параметров

ОНП	Праймеры		Длина фрагмента, п.н.	Температура отжига, °С	Концентрация MgCl ₂ , мМ
P249P	А-аллель	5'-ccgatgacttcacaagagataca-3'	161	57	1,5
	Т-аллель	5'-ccgatgacttcacaagagatact-3'			
	общий	5'-ccctaaccactgaccttgaata-3'			
L250L	Г-аллель	5'-tttgggttgtgtccaggatattc-3'	207	60	2,5
	С-аллель	5'-tttgggttgtgtccaggatattg-3'			
	общий	5'-atataggattctggaggaggcat-3'			

Таблица 2

Частоты генотипов и аллелей полиморфизмов L250L и P249P гена *TRPM8*

Популяции	Полиморфизмы									
	P249P					L250L				
	Генотипы, в % (N)			HWE χ^2	Частота Т-аллеля, %	Генотипы, в % (N)			HWE χ^2	Частота С-аллеля, %
	AA	AT	TT			GG	GC	CC		
Русские	94,6 (313)	5,1 (17)	0,3 (1)	2,056	0,029 ± 0,01	82,0 (847)	16,5 (171)	1,5 (15)	3,423	0,097 ± 0,01
Немцы	100 (149)	0	0	0	0	81,5 (128)	17,2 (27)	1,3 (2)	0,177	0,099 ± 0,02
Ханты	84,3 (43)	15,7 (8)	0 (0)	0,369	0,078 ± 0,03	90,2 (46)	7,8 (4)	2,0 (1)	4,449*	0,059 ± 0,02
Казахи	64,6 (82)	33,8 (43)	1,6 (2)	1,909	0,185 ± 0,02	62,5 (80)	33,6 (43)	3,9 (5)	0,068	0,207 ± 0,03
Тувинцы	78,9 (101)	19,5 (25)	1,6 (2)	0,098	0,113 ± 0,02	61,4 (81)	31,1 (41)	7,6 (10)	2,092	0,231 ± 0,03
Хакасы	82,8 (77)	16,1 (15)	1,1 (1)	0,078	0,091 ± 0,02	48,4 (45)	43,0 (40)	8,6 (8)	0,045	0,301 ± 0,03
Шорцы	80,0 (96)	17,5 (21)	2,5 (3)	1,834	0,112 ± 0,02	45,5 (61)	44,0 (59)	10,5 (14)	0,008	0,325 ± 0,03
Эскимосы	81,5 (75)	18,5 (17)	0	0,953	0,093 ± 0,02	49,4 (42)	32,9 (28)	17,7 (15)	6,070*	0,341 ± 0,04
Чукчи тундровые	51,9 (41)	40,5 (32)	7,6 (6)	0,005	0,278 ± 0,04*	50,6 (41)	37,0 (30)	12,3 (10)	1,414	0,309 ± 0,03**
Чукчи приморские	37,1 (49)	52,3 (69)	10,6 (14)	2,046	0,367 ± 0,03*	70,0 (98)	27,1 (38)	2,9 (4)	0,018	0,164 ± 0,02**

Примечание. N – количество индивидов. HWE – равновесие Харди–Вайнберга. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

(0,113), хакасы (0,091) и шорцы (0,113) имели близкие частотные значения.

Канадские эскимосы, относящиеся к арктическим монголоидам, по частотам обоих ОНП (0,093 – P249P и 0,341 – L250L) были близки к хакасам и шорцам. Высокие частотные значения полиморфизмов обнаружены у чукчей. Однако частоты ОНП тундровых чукчей (0,278 – P249P и 0,309 – L250L) достоверно отличались от приморских (0,367 – P249P и 0,164 – L250L).

Полученные результаты по распределению частоты L250L в популяциях Сибири и Дальнего Востока согласуются с данными, представленными в базе данных dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>). Так, частота С-аллеля L250L в европейских популяциях Западной и Северной Европы колебалась от 0,023 до 0,092, а у восточных монголоидов (китайцы и японцы) – от 0,170 до 0,389. Однако частота полиморфизма P249P

в изученной нами популяции русских более чем в 3 раза превосходила указанную в базе данных для европейской популяции (0,008).

По составу гаплотипов наиболее гомогенными оказались русские, немцы и ханты, у которых более 85 % гаплотипов были представлены GA гаплотипом, содержащим основные аллели ОНП (табл. 3). Частоты второго по встречаемости гаплотипа СА у русских и немцев имели примерно равные значения (0,098 и 0,104 соответственно). У хантов гаплотипы СА и GT встречались примерно с одинаковой частотой. Различия между русскими и немцами, а также русскими и хантами по гаплотипическому составу оказались недостоверными. Немцы отличались от хантов, хотя коэффициент гетерогенности F_{st} у них был невысокий – 0,032 (табл. 4). Казахи и тувинцы показали более низкие генетические различия с русскими, немцами и хан-

Таблица 3
Частоты гаплотипов по полиморфизмам
L250L и P249P гена *TRPM8*

Популяции	N	Частоты гаплотипов			
		GA	GT	CA	CT
Русские	154	0,859	0,0367	0,098	0,006
Немцы	149	0,896	0	0,104	0
Ханты	51	0,863	0,078	0,059	0
Казахи	118	0,611	0,182	0,199	0,008
Тувинцы	120	0,668	0,102	0,223	0,006
Шорцы	103	0,573	0,121	0,306	0
Хакасы	91	0,599	0,099	0,302	0
Эскимосы	64	0,551	0,090	0,340	0,019
Чукчи тундровые	76	0,498	0,199	0,213	0,090
Чукчи приморские	127	0,469	0,355	0,131	0,045

Примечание. N – число изученных индивидов.

тами, чем шорцы и хакасы. Так, у русских значения F_{st} составили 0,045 с тувинцами и 0,068 с казахами, в то время как с хакасами – 0,094, а с шорцами – 0,098. Аналогичное варьирование F_{st} наблюдали у немцев и хантов. Наибольшие значения F_{st} обнаружены между европеоидами, хантами и арктическими монголоидами.

Центральноазиатские монголоиды по составу гаплотипов были более гетерогенны. Частоты распространенного GA гаплотипа у них колебались от 0,628 (тувинцы) до 0,573 (шорцы). Близкие к ним значения имели эскимосы (0,551). Вторым по представленности гаплотипом в этих популяциях также являлся гаплотип CA, за исключением казахов. У казахов частота CA была сопоставима с гаплотипом GT. По составу гаплотипов казахи проявили сходство с тувинцами, но отличались как от шорцев и хакасов, так и от арктических монголоидов. Имеются сведения о том, что казахи и тувинцы были близки по генетическим маркерам генов главного комплекса гистосовместимости (HLA) (Ламажаа и др., 2003). Не обнаружены различия по частотам гаплотипов между тувинцами, шорцами и хакасами. Кроме того, шорцы и хакасы оказались близки к эскимосам. Частоты гаплотипов этнических групп центральноазиатских монголоидов и чукчей различались.

Наиболее гетерогенными по составу гаплотипов оказались чукчи. Частота распространенного GA гаплотипа у них не превышала 50 % (0,498 у тундровых и 0,469 у приморских). Частоты CA и GT гаплотипов в популяциях чукчей различались. Тундровые чукчи имели примерно равные частоты этих гаплотипов, в то время как у приморских частота GT была почти

Таблица 4
Значения коэффициента F_{st}

Популяции	F_{st}								
	Русские	Немцы	Ханты	Казахи	Тувинцы	Шорцы	Хакасы	Эскимосы	Чукчи тундровые
Немцы	0,004	–							
Ханты	0,006	0,032*	–						
Казахи	0,068*	0,105*	0,056*	–					
Тувинцы	0,045*	0,070*	0,055*	0,008	–				
Шорцы	0,098*	0,126*	0,103*	0,018*	0,006	–			
Хакасы	0,094*	0,121*	0,105*	0,022*	0,005	0,004	–		
Эскимосы	0,150*	0,186*	0,153*	0,038*	0,022*	0,002	0,001	–	
Чукчи тундровые	0,177*	0,230*	0,140*	0,020*	0,050*	0,032*	0,043*	0,038*	
Чукчи приморские	0,211*	0,265*	0,154*	0,056*	0,114*	0,114*	0,129*	0,134*	0,029*

Примечание. * Различия между популяциями достоверны при $P < 0,05$.

в 3 раза выше, чем СА. Кроме того, частота СТ гаплотипа у тундровых чукчей была в 2 раза выше приморских. Уровень гетерогенности между ними был невысокий, коэффициент F_{st} равнялся 0,029. По составу гаплотипов популяции чукчей достоверно различались. Полученные результаты согласуются с данными по полиморфизмам митохондриальной ДНК и гена *c-fms* (Воевода и др., 1994; Кузнецова и др., 2003). Разделение чукчей на две популяции основано на исторических и этнографических исследованиях (Левина, Потапова, 1956). Полагают, что современные приморские чукчи сформировались вследствие ассимиляции чукчами эскимосов. По полиморфизмам гена *TRPM8* эскимосы Канады отличались от чукчей, но проявили сходство с центральноазиатскими монголоидами (шорцами и хакасами). Ранее нами было показано, что по полиморфизмам гена *c-fms* изученные популяции эскимосов Канады и чукчей не различались (Кузнецова и др., 2003). На основании археологических и генетических исследований было сделано заключение о том, что предки современных эскимосов Канады когда-то проживали на юге Сибири (Goebel *et al.*, 2008). Изученные этнические группы монголоидов сформировались в результате сложных процессов этногенеза, включающих эффект основателя, генетический дрейф, смешивание, отбор и другие. Поэтому связаны ли наблюдаемые параллели в частотах аллелей и гаплотипов по изученным полиморфизмам гена *TRPM8* между центральноазиатскими монголоидами и эскимосами Канады с их общим происхождением, эффектом основателя или какими-то другими генетическими процессами – однозначно ответить трудно. Для выяснения роли данных полиморфизмов в адаптации к температуре требуются дополнительные исследования.

Таким образом, результаты межпопуляционного анализа показали, что европеоиды и ханты имели наиболее гомогенный состав гаплотипов по полиморфным сайтам P249P и L250L гена *TRPM8* по сравнению с монголоидами. Этнические группы центральноазиатских монголоидов, относящиеся к тюркоязычным народностям и проживающие на сопредельных территориях, оказались генетически близкими. Популяции арктических монголоидов различались между

собой по частотам гаплотипов. Тем не менее уровень межпопуляционной гетерогенности монголоидов был невысокий.

Работа была поддержана программой РАН «Биоразнообразие и динамика генофондов».

Литература

- Воевода М.И., Авксетюк А.В., Иванова А.В. и др. Молекулярно-генетические исследования в популяциях коренных жителей Чукотки. Анализ полиморфизма митохондриальной ДНК и генов алкоголь-метаболизирующих ферментов // Сиб. экол. журнал. 1994. Т. 2. С. 149–16.
- Кузнецова Т.Н., Ромашенко А.Г., Юдин Н.С. и др. Полиморфизмы экспрессирующихся в макрогенах генов *C-FMS* и *CCR5*: частотные распределения аллелей и генотипов в некоторых этнических группах Северной Азии // Генофонд населения Сибири. Новосибирск: СО РАН, 2003. С. 48–53.
- Ламажаа А.М., Сартакова М.Л., Прокофьев В.Ф., Гельфгат Е.Л. Частота встречаемости аллелей гена *HLA-DPB1* и антигенов локусов HLA-A, -B, -C, -D, -DR в тувинской популяции // Генофонд населения Сибири. Новосибирск: СО РАН, 2003. С. 74–79.
- Левина М.Г., Потапова Л.П. Народы Сибири. М.: Изд-во АН СССР, 1956.
- Смит К., Клко С., Кантор Ч. Пульс-электрофорез и методы работы с большими молекулами ДНК // Анализ генома: Сб. статей / Под ред. К. Дейвиса. М., 1990. С. 58–94.
- Caterina M.J., Rosen T.A., Tominaga M. *et al.* A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat // Nature. 1999. V. 398. № 6726. P. 436–441.
- Goebel T., Waters M. R., O'Rourke D.H. The late Pleistocene dispersal modern humans in the Americas // Science. 2008. V. 319. P. 1497–1502.
- McKemy D.D., Neuhauser W.M., Julius D. Identification of a cold receptor reveals general role for TRP channels in thermosensation // Nature. 2002. V. 416. P. 52–58.
- Nilius B., Talavera K., Owsianik G. *et al.* Gating of TRP channels: a voltage connection? // J. Physiol. 2005. V. 567. P. 33–36.
- Slatkin M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies // Genetics. 1995. V. 139. P. 457–462.
- Smith G.D., Gunthorpe M.J., Kelsell R.E. *et al.* TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein // Nature. 2002. V. 418. № 6894. P. 186–190.
- Tsavalier L., Shaper M.H., Morkowski S., Laus R. Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares

- high homology with transient receptor potential calcium channel proteins // *Cancer Res.* 2001. V. 61. P. 3760–3769.
- Voets T., Nilius B. TRPs make sense // *J. Membrane Biol.* 2003. V. 192. P. 1–8.
- Zaykin D.V., Pudovkin A.I. 2 programs to estimate significance of CHI-2 values using pseudoprobability test // *J. Heredity.* 1993. V. 84. P. 152–156.

POLYMORPHISM FOR THE COLD RECEPTOR GENE *TRPM8* IN ETHNIC GROUPS OF SIBERIA AND THE FAR EAST

T.A. Potapova¹, N.S. Yudin¹, V.N. Babenko¹, I.V. Pilipenko¹, V.F. Kobsev¹,
L.A. Gyrgol'kau², M.I. Voevoda²

¹ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia, e-mail:potapova@ngs.ru;

² Institute of Internal Medicine, SB RAMS, Novosibirsk, Russia

The interpopulational heterogeneity for single nucleotide polymorphisms rs28901637 (P249P) and rs11562975 (L250L) of the cold receptor gene *TRPM8* (2q31) in ethnic groups of Siberia and the Far East was studied. The haplotype structure of Russians, Germans and Khanties was found to be the most homogeneous, 85 % being represented by a single haplotype only. The genetic differences between Russians–Germans and Russians–Khanties were statistically insignificant. The Europeoids and Khanties were differentiated from ethnic groups of Mongoloids in haplotype frequencies. The Central Asian Mongoloids (Kazakhs, Tuvinians, Shorians, Khakases) inhabiting neighbouring territories were similar in haplotype frequencies, while the Arctic Mongoloids (Tundra Chukhis, Coastal Chukhis, Eskimos) were different in this respect. The low values of the F_{st} coefficient indicated a low heterogeneity level between Mongoloids.