

Полиморфный локус rs3088232 гена *BRDT* ассоциирован с риском идиопатического мужского бесплодия в выборке жителей Западно-Сибирского региона России

Вайнер А.С.^{1,2}, Нагайцев В.М.³, Королькова О.В.¹, Востриков В.В.³,
Осадчук Л.В.⁴, Печковский Е.В.¹, Малиновская И.С.⁵, Филипенко М.Л.¹

Polymorphism rs3088232 in the *BRDT* gene is associated with idiopathic male infertility in the West Siberian Region of Russia

Wainer A.S., Nagaitsev V.M., Korolkova O.V., Vostrikov V.V., Osadchuk L.V.,
Pechkovsky Ye.V., Malinovskaya I.S., Filipenko M.L.

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск

² Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск

³ Алтайский государственный медицинский университет, г. Барнаул

⁴ Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск

⁵ Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Вайнер А.С., Нагайцев В.М., Королькова О.В. и др.

Носительство аллельных вариантов генов, приводящих к нарушениям сперматогенеза, может быть причиной идиопатического мужского бесплодия. В настоящем исследовании был проведен анализ ассоциации локуса rs3088232 гена *BRDT* с риском данной патологии на выборке из 105 бесплодных пациентов и 230 здоровых мужчин. В результате работы была выявлена ассоциация аллеля G (OR = 1,80; CI 1,16—2,80; $p = 0,008$) и генотипа GG (OR = 6,47; CI 1,23—34,15; $p = 0,01$) с идиопатическим мужским бесплодием.

Ключевые слова: идиопатическое мужское бесплодие, ген *BRDT*, аллельные варианты генов.

Allelic variants of genes involved in spermatogenesis can contribute to the genetic predisposition to idiopathic male infertility. In the present study we investigated the association of polymorphism rs3088232 in the *BRDT* gene with the risk of this pathology on the sample of 105 infertile patients and 230 healthy controls. We revealed the association of allele G (OR = 1.80; CI 1.16—2.80; $p = 0.008$) and genotype GG (OR = 6.47; CI 1.23—34.15; $p = 0.01$) with idiopathic male infertility.

Key words: idiopathic male infertility, *BRDT* gene, allelic variants.

УДК 616.697-021.3-02:575.174.015.3(571.1)

Введение

Согласно статистике ВОЗ, каждая седьмая супружеская пара испытывает трудности с зачатием ребенка. При этом примерно в 20% случаев бесплодный брак обусловлен репродуктивными нарушениями у мужчины, а в 30—40% такие нарушения имеются у обоих супругов [6]. Причиной мужского бесплодия может быть инфекционно-воспалительное заболевание органов мочеполовой системы, расширение вен семенного канатика, врожденные аномалии развития (крипторхизм и др.), сексуальные расстройства, хирургическое

вмешательство в области малого таза, некоторые виды терапевтического лечения и т.д. Отдельно выделяют генетические причины мужского бесплодия, такие как хромосомные нарушения (например, синдром Клайнфелтера), микроделеции AZF-локуса Y-хромосомы, мутации гена *CFTR* [4]. Несмотря на значительный прогресс в области исследования физиологии репродуктивной системы мужчин и идентификацию новых факторов, приводящих к репродуктивным нарушениям, на сегодняшний день около 50% случаев мужского бесплодия имеет невыясненную этиологию. Такие случаи называют идиопатическим бесплодием.

Вероятно, одной из причин идиопатического бесплодия является носительство аллельных вариантов генов, ассоциирующихся с нарушением нормального течения сперматогенеза. Такие аллельные варианты могут быть высоко-, низко- или среднепенетрантными мутациями, изменяющими количество, стабильность, активность или другие характеристики белкового продукта. К настоящему времени уже проведен ряд исследований, посвященных поиску аллельных вариантов, ассоциированных с репродуктивными нарушениями у мужчин, в том числе один полногеномный анализ ассоциаций [1]. Тем не менее на российской популяции таких работ еще проводилось.

Цель исследования — анализ ассоциации полиморфного варианта rs3088232 гена *BRDT* с риском идиопатического бесплодия в выборке жителей Западно-Сибирского региона России. Данный ген экспрессируется в клетках зародышевого пути, а именно в сперматоцитах, на стадии пахитены и диплотены и в ранних сперматидеях и необходим для их дифференцировки. Белок BRDT принадлежит к белковому семейству BET, содержит два бромодомена, способных связывать ацетилированные лизины в составе гистона H4, и участвует в ремоделинге хроматина и формировании хромоцентра в головке сперматозоида [3, 5, 7, 8]. У мышей, гомозиготных по мутации, приводящей к отсутствию первого бромодомена, наблюдаются серьезные нарушения хроматинового ремоделинга, и такие мыши являются стерильными [3]. Полиморфная замена C/G в гене *BRDT* (rs3088232, частота встречаемости в европейских популяциях около 13%) приводит к аминокислотной замене Asn410Lys в белке BRDT и теоретически может иметь функциональные последствия, и поэтому была выбрана для анализа.

Материал и методы

В работе были использованы следующие реактивы: Tween 20 (Serva, США), додецил сульфат натрия (ICN, США); ферменты: Taq-ДНК-полимераза (ИХБФМ СО РАН, Россия), протеиназа К (Serva, США). Все остальные реактивы были отечественного производства и имели категорию не ниже «хч». Дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (dNTP), TaqMan-зонды и олигонуклеотидные праймеры были синтезированы в ИХБФМ СО РАН.

ДНК выделяли из венозной крови с использованием стандартной процедуры, включающей выделение и

лизис клеток крови, гидролиз белков протеиназой К, очистку ДНК экстракцией примесей фенол-хлороформом и осаждение ДНК этанолом.

Определение генотипов локуса rs3088232 гена *BRDT* проводили методом аллель-специфичной ПЦР в режиме реального времени с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I. ПЦР проводилась в конечном объеме 25 мкл, содержащем Tris-HCl (10 ммоль) (pH 8,9), KCl (55 ммоль); MgCl₂ (2,5 ммоль); 0,01%-й Tween 20; dNTP (0,2 ммоль); растворы олигонуклеотидных праймеров (5'-GAGTATGCCTTTATGTTACATC-3', 5'-CTTCAGAATCATCAGAAGAG-3', 5'-CTTCAGAATCATCAGAAGAC-3') (0,4 мкмоль), 20—100 нг ДНК и 2 ед. акт. Taq-ДНК-полимеразы. ПЦР проводили на ДНК-амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США) с начальной денатурацией при температуре 96 °С 2 мин, далее в течение 48 циклов: 96 °С 6 с, 58 °С 6 с, 72 °С 6 с, 80 °С 10 с. Кривые плавления снимались в диапазоне температур 70—96 °С с шагом 0,5 °С.

В исследуемую группу вошли 108 пациентов, проживающих в г. Новосибирске (возраст от 23 до 42 лет, средний возраст 32 года), у которых на основании клинического и лабораторного исследований, включающих анализ истории болезни, физическое обследование, анализ спермы, УЗИ мошонки, гормональный анализ, анализ кариотипа и скрининг Y-хромосомы на микроделеции, было диагностировано бесплодие неизвестного генеза. Диагноз «азооспермия» имели 38 пациентов и 70 — «олигозооспермия». Были исключены из анализа 3 пациента, имеющие микроделеции AZF-локуса Y-хромосомы. В группу контроля вошли 230 мужчин (средний возраст 35 лет) с нормозооспермией, имеющих по крайней мере одного ребенка.

Сравнение частот встречаемости аллелей и генотипов локуса rs3088232 в исследуемых группах с целью выявления ассоциации с риском мужского идиопатического бесплодия проводили с использованием критерия χ^2 , тест на соответствие распределения генотипов равновесию Харди—Вайнберга — с использованием точного критерия. Различия в частотах считали статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$. Для оценки величины относительного риска использовали отношение шансов OR с его 95%-м доверительным интервалом CI. Вычисления

производили с помощью он-лайн программы DeFinetti (<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>).

Результаты

Частоты аллелей и генотипов полиморфного локуса rs3088232 гена *BRDT*, определенные в группе бесплодных пациентов и в контрольной группе фертильных мужчин, представлены в таблице. Распределение частот генотипов в выборке здоровых мужчин соответствовало закону Харди—Вайнберга ($p = 0,54$). Частота аллеля G в выборке бесплодных мужчин (20%) статистически значимо отличалась от таковой в выборке здоровых мужчин (12%), $p = 0,008$. Частота генотипа GG в группе бесплодных мужчин (5%) была выше частоты этого генотипа в контрольной группе (1%), и различия также достигли статистической значимости ($p = 0,01$). Значения OR и CI для аллелей и генотипов приведены в таблице.

Частоты аллелей и генотипов полиморфного локуса rs3088232 гена BRDT в выборках бесплодных и фертильных мужчин. Анализ ассоциации rs3088232 с риском идиопатического бесплодия

Генотип или аллель	Бесплодные мужчины	Фертильные мужчины	OR, CI, p
Генотип	0,65 (68)	0,77 (176)	1,00
CC	0,30 (32)	0,23 (52)	1,59; 0,95—2,68; 0,08 (CG vs CC)
Генотип	0,05 (5)	0,01 (2)	6,47; 1,23—34,15; 0,01 (GG vs CG)
CG	0,80	0,88	CC)
Генотип	0,20	0,12	1,00
GG			1,80; 1,16—2,80; 0,008 (G vs C)
Аллель C			
Аллель G			

Обсуждение

В настоящей работе были определены частоты аллелей и генотипов полиморфного локуса rs3088232 гена *BRDT* в выборке мужчин, страдающих бесплодием неизвестного генеза, и в контрольной группе фертильных мужчин (таблица). Частота минорного аллеля G в контрольной группе составила 12%, что соответствует данным по другим популяциям европеоидного происхождения.

В результате статистической обработки полученных данных была выявлена ассоциация аллеля G и генотипа GG с увеличением риска мужского бесплодия (OR = 1,80; CI 1,16—2,80; $p = 0,008$ и OR = 6,47; CI 1,23—34,15; $p = 0,01$ соответственно).

Локус rs3088232 гена *BRDT* ранее анализировался в двух работах — исследовании Aston и соавт. на выборке мужчин европеоидного происхождения [2] и работе Plaseski и соавт. на выборке македонских и албанских мужчин [6]. В первой работе данный локус показал ассоциацию аллеля G с олигозооспермией тяжелой степени ($p = 0,03$), во второй — с азооспермией в подгруппе мужчин македонского происхождения (OR = 2,17; CI 1,23—3,83; $p = 0,008$). Данные, полученные в настоящей работе, подтвердили эти ассоциации на выборке российских пациентов. Тем не менее в представленной работе не анализировались отдельно подгруппы мужчин с азооспермией и олигозооспермией в связи с малым размером данных подгрупп. Для прояснения роли полиморфного локуса rs3088232 в этиологии этих форм мужского бесплодия требуется проведение дальнейших исследований на выборках большего размера.

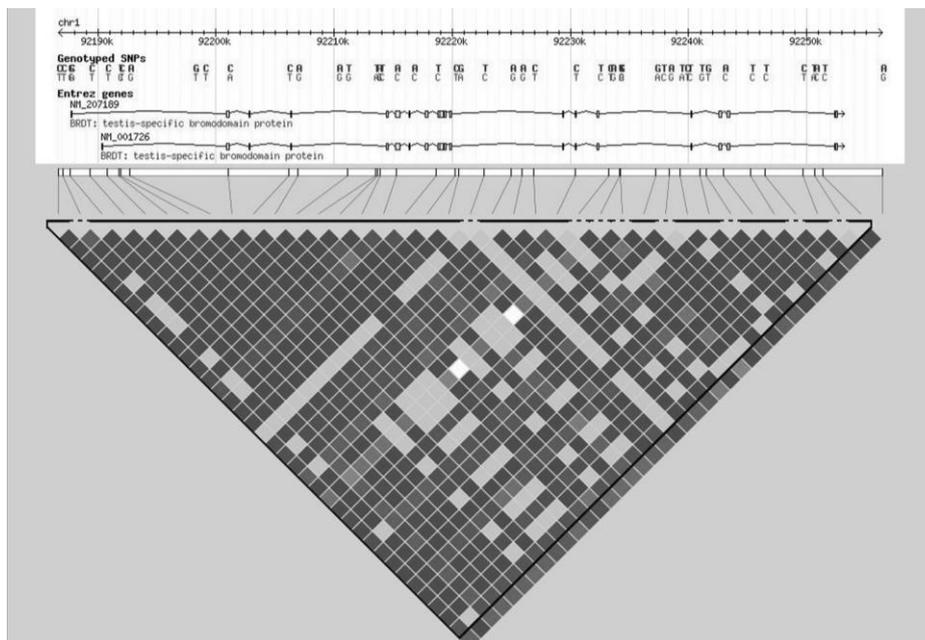


Схема гена *BRDT* человека, полученная с помощью программы Haploview 4.2, иллюстрирующая его локализацию в блоке неравновесия по сцеплению

Нуклеотидная замена C/G (rs3088232) в гене *BRDT* приводит к аминокислотной замене Asn410Lys в белке BRDT. Функциональная роль этой замены в настоящее время остается невыясненной. Поскольку ген *BRDT* расположен в протяженном блоке неравновесия по сцеплению (в соответствии с данными HapMap, www.hapmap.org, рисунок), то, вероятно, rs3088232 может быть на самом деле сцеплен с каким-либо другим функциональным локусом, изменяющим характеристики белка BRDT и являющимся истинно ассоциированным с мужским бесплодием. Анализ ассоциации гаплотипов позволит установить, какой именно из сцепленных локусов обуславливает увеличение риска развития данной репродуктивной патологии.

Работа была выполнена при финансовой поддержке Интеграционного гранта СО РАН № 84 и 17, а также Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009—2013 гг., ГК № 16.740.11.0633 от 02.06.2011 г.

Литература

1. Aston K.I., Carrell D.T. Genome-wide study of single-nucleotide polymorphisms associated with azoospermia and

severe oligozoospermia // J. Androl. 2009. V. 30, № 6. P. 711—725.
 2. Aston K.I., Krausz C., Laface I. et al. Evaluation of 172 candidate polymorphisms for association with oligozoospermia or azoospermia in a large cohort of men of European descent // Hum Reprod. 2010. V. 25. № 6. P. 1383—1397.
 3. Berkovits B.D., Wolgemuth D.J. The first bromodomain of the testis-specific double bromodomain protein Brdt is required for chromocenter organization that is modulated by genetic background // Dev. Biol. 2011. [published ahead of print].
 4. Ferlin A., Arredi B., Foresta C. Genetic causes of male infertility // Reprod Toxicol. 2006. V. 22, № 2. P. 133—141.
 5. Moriniere J., Rousseaux S., Steuerwald U. et al. Cooperative binding of two acetylation marks on a histone tail by a single bromodomain // Nature. 2009. V. 461, № 7264. P. 664—668.
 6. Plaseski T., Noveski P., Popeska Z. et al. Association Study of Single Nucleotide Polymorphisms in FASLG, JMJDIA, LOC203413, TEX15, BRDT, OR2W3, INSR and TAS2R38 Genes with Male Infertility // J. Androl. 2011. [published ahead of print].
 7. Pivot-Pajot C., Caron C., Govin J. et al. Acetylation-dependent chromatin reorganization by BRDT, a testis-specific bromodomain-containing protein // Mol. Cell. Biol. 2003. V. 23, № 15. P. 5354—5365.
 8. Shang E., Nickerson H.D., Wen D. et al. The first bromodomain of Brdt, a testis-specific member of the BET sub-family of double-bromodomain-containing proteins, is essential for male germ cell differentiation // Development. 2007. V. 134, № 19. P. 3507—3515.

Поступила в редакцию 11.11.2011 г.

Сведения об авторах

А.С. Вайнер, группа фармакогеномики ИХБФМ СО РАН, кафедра молекулярной биологии НГУ (г. Новосибирск).

В.М. Нагайцев — канд. мед. наук, кафедра акушерства и гинекологии АГМУ (г. Барнаул).

О.В. Королькова, группа фармакогеномики ИХБФМ СО РАН (г. Новосибирск).

В.В. Востриков — канд. мед. наук, кафедра акушерства и гинекологии АГМУ (г. Барнаул).

Л.В. Осадчук — д-р биол. наук, лаборатория эндокринологической генетики Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск).

Е.В. Печковский, группа фармакогеномики ИХБФМ СО РАН (г. Новосибирск).

И.С. Малиновская — канд. мед. наук, кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии СибГМУ (г. Томск).

М.Л. Филипенко — канд. биол. наук, руководитель группы фармакогеномики ИХБФМ СО РАН (г. Новосибирск).

Для корреспонденции

Филипенко Максим Леонидович, тел.: 8 (383) 363-51-71; e-mail: max@niboch.nsc.ru