

В.Є. Досенко, В.Ю. Загорій, Н.В. Хайтович, О.А. Гордок, О.О. Мойбенко

Алельний поліморфізм гена ендотеліальної NO-синтази та його функціональні прояви

Исследование механизмов фенотипической реализации аллельного полиморфизма гена эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) показало, что содержание РНК eNOS и активность этого фермента в тромбоцитах зависит от генотипа. С помощью метода обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции установлено, что содержание матричной РНК eNOS наименьшее при генотипе -786С/С промотора. У гомозигот (894Т/Т) по 7-му экзону содержание РНК меньше, чем у нормальных гомозигот (894G/G), однако превышает таковое у гетерозигот (894G/T). При полиморфизме 4-го интрона наблюдается противоположная ситуация – содержание РНК в тромбоцитах людей с генотипом 4a/4a больше, чем при генотипе 4b/4a и 4b/4b. При определении активности eNOS в тромбоцитах с использованием диаминофлуоресцеина диацетата (DAF-2A) было установлено, что у носителей генотипа -786С/С промотора NO-продуцирующая активность в 2,1 раза меньше, чем у нормальных гомозигот ($P=0,03$), и в 2,9 раза ниже по сравнению с гетерозиготами ($P>0,05$). Активность eNOS при варианте 894Т/Т 7-го экзона также меньше, чем у нормальных гомозигот ($P>0,05$). Активность eNOS при полиморфизме 4-го интрона была в 1,7 раза меньше у носителей генотипа 4a/4a по сравнению с нормальными гомозиготами ($P>0,05$) и в 1,9 раза меньше, чем у гетерозигот ($P>0,05$). Полученные результаты указывают на то, что полиморфизм T⁻⁷⁸⁶→C промотора гена eNOS наиболее существенно влияет на его экспрессию и активность белка eNOS.

ВСТУП

Про роль алельного поліморфізму гена ендотеліальної NO-синтази (eNOS) відомо досить багато. Більшість дослідників прийшли до висновку, що певні алельні варіанти можуть підвищувати ймовірність розвитку серцево-судинних захворювань [1, 2, 5, 11, 19, 22]. Проте досі остаточно не з'ясовано, яким чином поліморфізм гена впливає на його експресію та активність ферменту в клітинах. Вивчення механізмів фенотипової реалізації патологічних алельних варіантів гена eNOS дало змогу припустити, що зниження продукції NO може бути зумовлено або утворенням білка в недостатній кількості чи зі зміненою активністю (порушення транскрипції, стабільності матричної РНК, утворення каталітично дефектного білка), або прискореною деградацією ферменту [1,

6, 8, 18]. У перших роботах, присвячених вирішенню цього питання, дослідники намагалися довести вплив поліморфізму гена eNOS на вміст нітратів у плазмі крові. Виявилось, що концентрація нітратів і нітритів (NO_x) в плазмі крові людей із алельним поліморфізмом 7-го екзону (Glu 298/Asp) була значно вищою у носіїв генотипів Glu/Asp та Asp/Asp, ніж у носіїв нормального гена (Glu/Glu) [21]. Мікросателітний поліморфізм 4-го інтрону також впливав на вміст NO_x у плазмі крові – у носіїв алелю 4a/4a, що зустрічається досить рідко, вміст NO_x був значно вищим, ніж у носіїв нормального алелю (4b/4b). Отже, мутаційні зміни в гені eNOS можуть призводити до збільшення концентрації NO_x у плазмі крові, яке може відбуватися зовсім не внаслідок підвищення активності eNOS, а інших NO-продукуючих систем, зокрема

© В.Є. Досенко, В.Ю. Загорій, Н.В. Хайтович, О.А. Гордок, О.О. Мойбенко

індуцибельної NOS (iNOS) [3]. Цей фермент здатний продукувати NO у значно більшій кількості, ніж eNOS, а, отже, призводить до збільшення загальної концентрації NO_x у крові. Недостатня інформативність зазначеного підходу була показана англійськими дослідниками, які визначили вміст NO_x у 1121 пацієнта з визначеним поліморфізмом промотору, 7-го екзону та 4-го інтрону eNOS [13]. Жодних відмінностей у вмісті NO_x встановлено не було. Група австрійських дослідників пішла іншим шляхом [8]. Вони експресували різні алельні варіанти 7-го екзону в дріжджовій системі, отримували очищений білок eNOS “дикого” типу (Glu/Glu) і білок із заміною Glu на Asp та встановили, що мутантний варіант білка не поступається ні за афінністю до аргініну, ні за інтенсивністю утворення цитруліну, оксидо-редуктазною активністю, чутливістю до кальцію, кальмодулінзв’язувальною активністю та іншими властивостями. Однак, відсутність відмінностей ізольованого білка не обов’язково свідчить про те, що аналогічна закономірність буде спостерігатися в живих клітинах, де активність eNOS в кавеолах цитоплазматичної мембрани контролюється багатьма іншими білками. Наступним кроком до з’ясування функціонального поліморфізму гена eNOS стали дослідження Song та співавт. [18], які вивчали експресію гена eNOS, концентрацію та активність ферменту в культивованих ендотеліальних клітинах людей з відомим генотипом. Незважаючи на те, що автором не вдалося дослідити зазначені показники при наявності патологічних алелів в гомозиготному стані, отримані результати надзвичайно важливі. Було встановлено, що вміст білка та активність eNOS значно вища у носіїв генотипу 4b/4b, але не залежить від поліморфізму 7-го екзону. Вміст РНК eNOS суттєво не відрізнявся у власників різних алельних варіантів 4-го інтрону та 7-го екзону. Таким чином, якщо нехтувати впливом умов культивування, можна припустити, що

на активність eNOS впливає саме 4-й інтрон.

Мета нашої роботи – дослідити активність експресії гена eNOS та ферменту NO-синтази в тромбоцитах, ізольованих від осіб, що були генотиповані за промотором, 7-м екзоном та 4-м інтроном гена eNOS.

МЕТОДИКА

Матеріалом дослідження була венозна кров 30 підлітків, хворих на артеріальну гіпертензію, що проходили лікування в клініці кафедри педіатрії №4 Національного медичного університету ім. О.О.Богомольця. Венозну кров набирали в стерильних умовах у моновети об’ємом 2,7 мл з калієвою сіллю етилендіамінтетраоцтової кислоти (11,7 ммоль/л) як антикоагулянту (“Sargstedt”, Німеччина), а для попередження адгезії та агрегації тромбоцитів використовували апіразу (1 ОД/мл). Виділення тромбоцитів відбувалося в три етапи: центрифугування (100 g) крові протягом 5 хв (супернатант містив тромбоцити та моноцити); центрифугування (400 g) протягом 2 хв (моноцити осідають на дно пробірки, а тромбоцити залишаються у верхньому шарі); центрифугування (900 g) протягом 6 хв з наступним ресуспензуванням тромбоцитів у буфері Тіроде такого складу (у ммоль/л): NaCl – 137, NaHCO_3 – 12, KCl – 2, Na_2HPO_4 – 0,34, MgCl_2 – 1, глюкози – 5,5, HEPES – 5, рН 7,3. Цей буфер також містив 0,35 % сироваткового альбуміну бика [15]. Підрахунок кількості тромбоцитів проводили в камері Горяєва.

Виділення РНК із тромбоцитів проводили з використанням набору Trizol RNA-prep (“Isogen”, Росія), зворотну транскрипцію – з використанням RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (“Fermentas”, Литва), застосовуючи 500 нг загальної РНК та олігомерний (dT)₁₈ праймер. Отриману одноланцюгову ДНК використовували для полімеразної ланцюгової реакції (PCR) із застосуванням наступної пари праймерів: прямий (sense) – 5`-TCC CTG AGG AGG

GCA GGC-3' та зворотний (antisense) – 5'-TGA GGG TCA CAC AGG TTC CT-3'. Ампліфікаційна суміш містила 5 мкл 5-кратного PCR-буфера, 2,5 ммоль/л сульфату магнію, 200 моль/л суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 20 пмоль/л кожного з праймерів та 0,5 ОД Taq-полімерази ("АмпліСенс", Росія), об'єм довели до 25 мкл деіонізованою водою. Ампліфікація фрагмента 7-го екзону складалася з 35 циклів: денатурація – 94°C, 1 хв, приєднання праймерів – 64°C, 1 хв і елонгація – 74°C, 1 хв. Для контролю за якістю виділення РНК та порівняння інтенсивності експресії гена eNOS паралельно ампліфікували фрагмент гена β -актину – одного із house-keeping генів за описаним методом [16]. Ампліфікати розділяли в 2,5%-му агарозному гелі, що містив бромистий етидій. Візуалізація та оцінка яскравості ампліфікатів після горизонтального електрофорезу (160 V протягом 40 хв) проводилася за допомогою транслюмінатора та програмного забезпечення ViTran ("Біоком", Росія).

Для визначення активності eNOS використовували флуориметричну детекційну систему FCANOS-1 ("Sigma", США), в основу якої покладено принцип флуоресценції триазолофлуоресцеїну, що утворюється після взаємодії NO з 4,5-діамінофлуоресцеїном, який, у свою чергу, утворюється з 4,5-діамінофлуоресцеїну діацетату (DAF-2A) під дією внутрішньоклітинних естераз. Довжина хвиль збудження/поглинання становила 492/515 нм. Інгібітор NOS діфеніленійодоній хлорид (100 мкмоль/л) пригнічував реакцію, що підтверджувало специфічність вимірювання активності NOS. Активність ферменту виражали в одиницях флуоресценції (UF) за хв на 10^6 клітин. В організмі ссавців є небагато клітин, що експересують тільки одну ізоформу NO-синтази. Докази того, що за нормальних умов у тромбоцитах міститься тільки ендотеліальна NOS [12, 17], дозволили нам досить впевнено стверджувати,

що досліджувалася активність саме цієї ізоформи ферменту.

ДНК виділяли з венозної крові, стабілізованої як указано вище, з використанням набору DNA-прер ("Isogene", Росія). Методом PCR з наступним аналізом довжини рестрикційних фрагментів визначали T⁻⁷⁸⁶→C поліморфізм промотору, G⁸⁹⁴→T поліморфізм 7-го екзону та 4-го інтрону гена eNOS як описано раніше [2, 7, 10, 20]. PCR проводили в термоциклері GeneAmp System 2700 ("Applied Biosystems", США).

Отримані результати обробляли статистично з використанням програми Excel 2000 та Origin 7,0. При цьому вірогідність різниці середніх величин (P<0,05) визначали за критерієм t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

За результатами генотипування виявилось, що при дослідженні T⁻⁷⁸⁶→C поліморфізму промотору гена eNOS у 11 осіб був генотип T/T, у 13 – T/C та у 6 – C/C; при дослідженні G⁸⁹⁴→T поліморфізму 7-го екзону у 11 осіб був генотип G/G, у 14 – G/T, у 5 – T/T; при дослідженні 4b/4a поліморфізму 4-го інтрону у 18 осіб виявлено генотип 4b/4b, у 9 – 4b/4a, у 3 – 4a/4a. Розподіл частот зазначених алельних варіантів у цілому відповідає такому в українській популяції [2].

Отримані результати свідчать про те, що вміст РНК eNOS у тромбоцитах залежить від генотипу хворого (рис. 1, 2, I). З'ясувалося, що вміст матричної РНК eNOS найменший при генотипі C/C промотору. У патологічних гомозигот (T/T) за 7-м екзоном вміст РНК менше, ніж у нормальних гомозигот (G/G), однак перевищує такий у гетерозигот (G/T). При поліморфізмі 4-го інтрону спостерігається протилежна ситуація – вміст РНК у тромбоцитах людей з генотипом 4a/4a був вищим, ніж у нормальних гомозигот та гетерозигот.

Наші результати узгоджуються з отриманими Nakayama M. та співавт., де було використано люциферазний тест [13]. Цими

вченими встановлено, що при трансверсії $T^{-786} \rightarrow C$ значно зменшується активність промотору, бо за введення в ендотеліальні клітини генетичної конструкції, що включала нормальний або патологічний варіант промотору разом з вектором гена люциферази, експресія останньої була меншою при заміні $T^{-786} \rightarrow C$ в промоторі. При моделюванні гіпоксії на цих трансфікованих клітинах активність люциферази збільшувалася на 69 % у разі трансверсії в промоторі, тоді як при нормальному варіанті промотору – на 110 %. Cattaruzza M. та співавт.

[6] отримав додаткові свідчення про функціональну неповноцінність промотору в разі заміни T^{-786} на C [6]. Вміст РНК білка eNOS в ендотеліальних клітинах за звичайних умов культивування відрізнявся у нормальних гомозигот (T/T), гетерозигот (T/C) та патологічних гомозигот (C/C) незначною мірою, проте різко змінювався при відтворенні тиску зсуву (shear stress). Якщо в клітинах від донорів з генотипом T/T вміст РНК eNOS збільшувався майже втричі, а вміст білка eNOS – у 2,5 раза, то при генотипі C/C – не відрізнявся від ви-

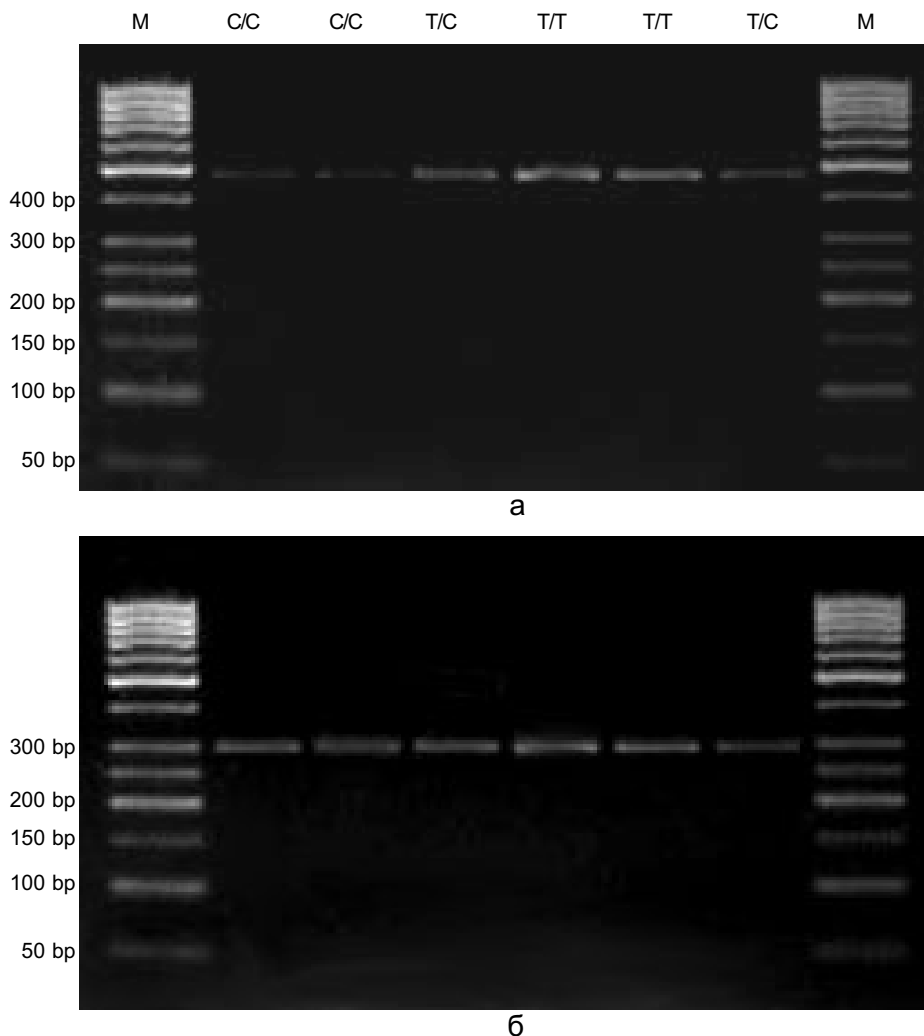


Рис. 1. Результати електрофорезу ампліфікатів фрагменту 7-го екзону гена eNOS (а) та гена β -актину (б), що вказують на залежність експресії гена eNOS від того чи іншого варіанта поліморфізму промотору. М – маркер молекулярної маси (50 bp, 100 bp і далі – кількість пар нуклеїнових основ), T/T – нормальні гомозиготи, T/C – гетерозиготи, C/C – патологічні гомозиготи

хідного значення. Експресія генів у тромбоцитах, що були використані нами для вирішення цього питання, звісно, неможлива – ген eNOS транскрибується в кістково-мозкових попередниках тромбоцитів (мегакаріоцитах). Однак тромбоцити здатні використовувати РНК для синтезу білків на полісомах [4], а, отже, зміни вмісту РНК eNOS у цих клітинах також можуть впливати на рівень трансляції білка eNOS та його активність.

При дослідженні активності eNOS у тромбоцитах нами було встановлено (див. рис. 2,II), що у носіїв генотипу C/C промотору NO-продукуюча здатність в 2,1 раза менша, ніж у нормальних гомозигот ($P=0,03$), та у 2,9 раза, нижча, ніж у гетерозигот ($P>0,05$). Тобто дані про експресію гена повністю збігаються з напрямком змін активності eNOS при поліморфізмі промотору. Активність eNOS при патологічному варіанті 7-го екзону також менша, ніж у

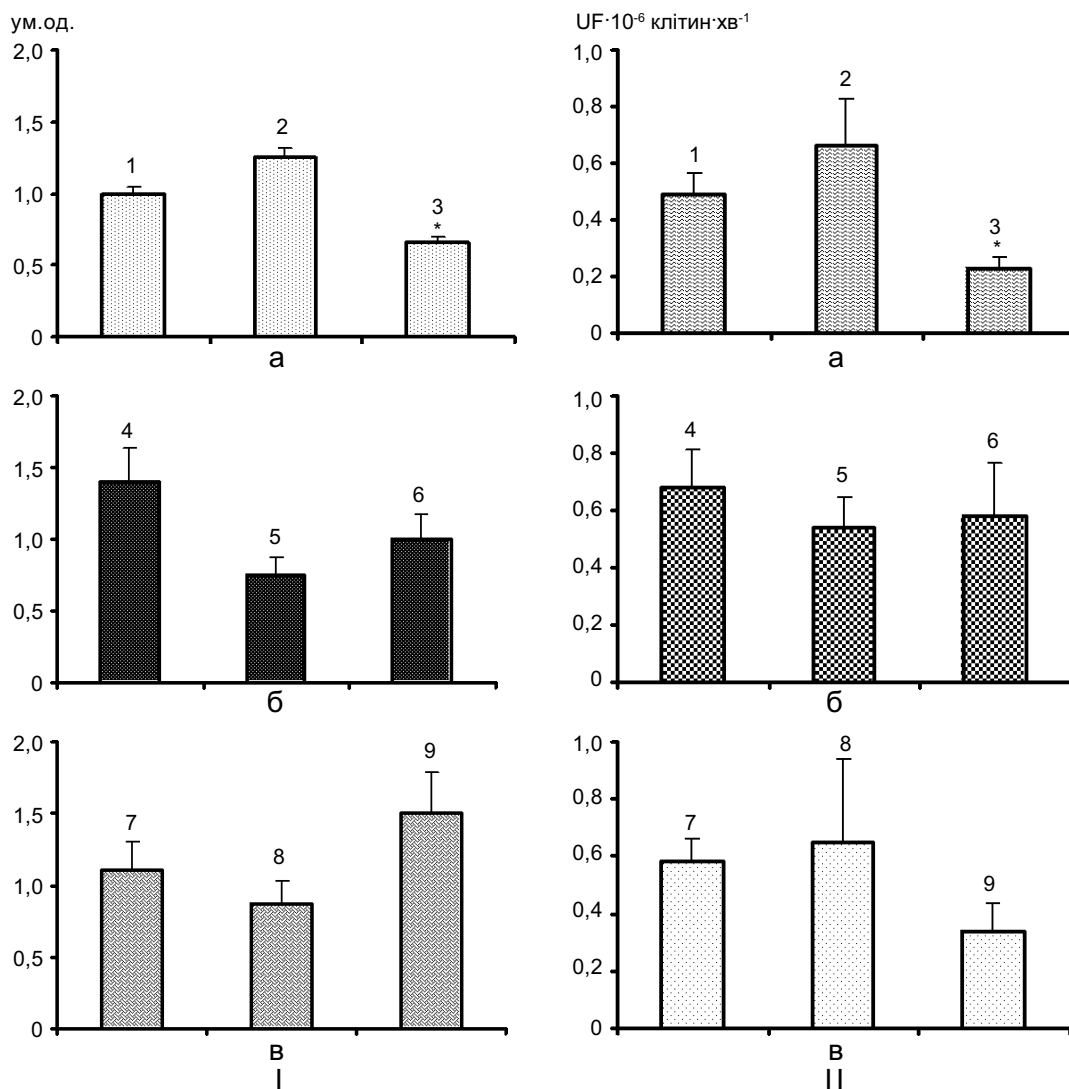


Рис. 2. Вміст РНК (I) та активність (II) ендотеліальної NO-синтази (eNOS) в ізольованих тромбоцитах при різних алейних варіантах промотору (а), 7-го екзону (б) та 4-го інтрону (в) гена eNOS. 1 – варіант промотору Т/Т, 2 – Т/С, 3 – С/С, 4 – варіант 7-го екзону G/G, 5 – G/T, 6 – Т/Т, 7 – варіант 4-го інтрону 4b/4b, 8 – 4b/4a, 9 – 4a/4a. * $P<0,05$ порівняно з експресією гена eNOS та активністю ферменту при генотипі Т/Т промотору

нормальних гомозигот, однак різниця виявилася невірною. Аналогічна ситуація спостерігається і при порівнянні активності eNOS за поліморфізму інтрону. Активність ферменту була в 1,7 раза меншою у носіїв генотипу 4a/4a порівняно з нормальними гомозиготами ($P>0,05$) та у 1,9 рази меншою, ніж у гетерозигот ($P>0,05$). Позитивного зв'язку між експресією гена eNOS та активністю ферменту eNOS при поліморфізмі інтрону не спостерігається. Навпаки, на фоні підвищеної експресії в осіб з генотипом 4a/4a реєструвалася менша активність ферменту. Не виключено, що зчитування гена eNOS при цьому варіанті інтрону дійсно відбувається більш активно, проте РНК, що утворюється, є певною мірою дефектною і більша кількість молекул білка eNOS не синтезується або цей білок має меншу каталітичну активність. У дослідженні Hassan A. та співавт. припускається протективний ефект варіанта інтрону 4a [9]. Встановлено, що вміст NO_x у плазмі крові значно вищий у людей з генотипом C/C промотору в сполученні із алелем 4a інтрону. Однак більшість дослідників схиляються до думки, що алель 4a є патологічним і частіше зустрічається у хворих на серцево-судинні захворювання [1, 5, 13, 19, 21], а щодо інформативності визначення NO_x у плазмі крові для оцінки функціонального значення поліморфізму йшлося вище.

Таким чином, отримані результати певною мірою пояснюють патогенетичне значення поліморфізму промотору гена eNOS. При порушенні коронарного кровообігу в індивідуумів з патологічним варіантом промотору значно меншою мірою активується транскрипція гена eNOS, кількості її молекул, що утворюється, не вистачає для синтезу додаткової кількості NO. Внаслідок цього судини розширюються меншою мірою, адгезія та агрегація тромбоцитів не попереджується і виявляються недостатніми інші механізми ангіо- та кардіопротекторної дії монооксиду азоту. Питання про функціональну реалізацію по-

ліморфізму 7-го екзону та 4-го інтрону залишається відкритим та потребує проведення подальших досліджень.

**V.E. Dosenko, V.Yu. Zagoriy, N.V. Haitovich,
O.A. Gordok, O.O. Moibenko**

ALLELIC POLYMORPHISM OF ENDOTHELIAL NO-SYNTASE GENE AND ITS FUNCTIONAL MEANING

Investigation of phenotypic realization of the eNOS gene allelic polymorphism has shown that eNOS RNA content and eNOS activity in platelets depends on genotype. Using the reverse transcription and polymerase chain reaction it was shown that eNOS mRNA content is the lowest at -786C/C promoter's genotype. In exon 7 homozygotes (894T/T) the RNA level is lower than in normal homozygotes (894G/G), but it is higher than in heterozygotes (894G/T). Contrary, at intron 4 polymorphism the RNA level in the platelets from people with 4a/4a genotype is higher than in normal homozygotes and heterozygotes. Measuring of eNOS activity in platelets using diaminofluorescein diacetate (DAF-2A) showed that in carriers of 786C/C promoter genotype NO-producing activity is 2.1 times lower than in normal homozygotes ($P=0.03$) and 2.9 times lower comparing to heterozygotes ($P>0.05$). eNOS activity at 894T/T variant of 7-th exon is also lower than in normal homozygotes ($P>0.05$). Analogous data has been obtained while comparing eNOS activity at intron 4 polymorphism – enzyme activity was 1.7 times lower in carriers of 4a/4a genotype comparing to normal homozygotes ($P>0.05$) and 1.9 times lower than in heterozygotes ($P>0.05$). Data obtained permits to conclude, that T⁻⁷⁸⁶→C polymorphism of eNOS gene promoter effects the gene expression and eNOS activity the most significantly.

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Science of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Досенко В.Є., Загорій В.Ю., Мойбенко О.О., Пархоменко О.М. Патологічні аспекти генетичного поліморфізму ендотеліальної NO-синтази // Фізіол. журн. – 2002. – 48. – №6. – С.86–102.
2. Досенко В.Є., Лутай Я.М., Загорій В.Ю. и др. Частота алельного поліморфізму гена ендотеліальної NO-синтази у больных с острым коронарным синдромом в української популяції // Цитология и генетика. – 2005. – № 2. – С.10–18.
3. Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition // Biochem. J. – 2001. – 357. – P.593–615.

4. Belloc F., Hourdille P., Boisseau M.R., Bernard P. Protein synthesis in human platelets correlation with platelet size // *Nouv. Rev. Fr. Hematol.* – 1982. – **24**, № 6. – P.369–73.
5. Casas J.P., Bautista L.E., Humphries S.E., Hingorani A.D. Endothelial nitric oxide synthase genotype and ischemic disease. Meta-analysis of 26 studies involving 23028 subjects // *Circulation.* – 2004. – **109**. – P.1359–1365.
6. Cattaruzza M., Guzik T.J., Slodowski W. et al. Shear stress insensitivity of endothelial nitric oxide synthase expression as genetic risk factor for coronary heart disease // *Circulat. Res.* – 2004. – **95**. – P.841–847.
7. Ghilardi G., Biondi M.L., DeMonti M. et al. Independent risk factor for moderate to severe internal carotid artery stenosis: T786C mutation of endothelial nitric oxide synthase gene // *Clin. Chem.* – 2002. – **48**, № 7. – P.989–993.
8. Golser R., Gorren A.C.F., Mayer B., Schmidt K. Functional characterization of Glu298Asp mutant human endothelial nitric oxide synthase purified from a yeast expression system // *Nitric Oxide.* – 2003. – **8**. – P.7–14.
9. Hassan A., Gormley K., O'Sullivan M. et al. Endothelial nitric oxide gene haplotypes and risk of cerebral small-vessel disease // *Stroke.* – 2004. – **35**. – P.654–659.
10. Hibi K., Ishigami T., Tamura K. et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction // *Hypertension.* – 1998. – **32**, № 3. – P.521–526.
11. Hingorani A.D., Liang C.F., Fatibene J. et al. A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298→Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK // *Circulation.* – 1999. – **100**, № 14. – P.1515–1520.
12. Jayachandran M., Miller V.M. Ovariectomy upregulates expression of estrogen receptors, NOS, and HSPs in porcine platelets // *Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2002. – **283**. – H220–H226.
13. Jeerooburkhan N., Jones L.C., Bujac S. et al. Genetic and environmental determinants of plasma nitrogen oxides and risk of ischemic heart disease // *Hypertension.* – 2001. – **38**. – P.1054–1061.
14. Nakayama M., Yasue H., Yoshimura M. et al. T-786→C Mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm // *Circulation.* – 1999. – **99**. – P.2864–2870.
15. Oury C., Toth-Zsomboki E., Vermylen J., Hoylaerts M.F. P2X(1)-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase 2 contributes to platelet secretion and aggregation induced by collagen // *Blood.* – 2002. – **100**, № 7. – P.2499–2505.
16. Ovstebo R., Haug K.B.F., Lande K., Kierulf P. PCR-based calibration curves for studies of quantitative gene expression in human monocytes: development and evaluation // *Clin. Chem.* – 2003. – **49**, № 3. – P.425–432.
17. Randriamboavonjy V., Schrader J., Busse R., Fleming I. Insulin induces the release of vasodilator compounds from platelets by a nitric oxide-G kinase-VAMP-3-dependent pathway // *J. Exp. Med.* – 2004. – **199**, № 3. – P.347–356.
18. Song J., Yoon Y., Park K.U. et al. Genotype-specific influence on nitric oxide synthase gene expression, protein concentration, and enzyme activity in cultured human endothelial cells // *Clin. Chem.* – 2003. – **49**, № 6. – P.847–852.
19. Wang J., Dudley D., Wang X.L. Haplotype-specific effects on endothelial NO synthase promoter efficiency: modifiable by cigarette smoking // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2002. – **22**, № 5. – P.1–4.
20. Wang X.L., Sim A.S., Wang M.X. et al. Genotype dependent and cigarette specific effects on endothelial nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity // *FEBS Lett.* – 2000. – **471**, № 1. – P.45–50.
21. Yoon Y., Song J., Hong S.H., Kim J.Q. Plasma nitric oxide concentrations and nitric oxide synthase gene polymorphisms in coronary artery disease // *Clin. Chem.* – 2000. – **46**, № 10. – P.1626–1630.
22. Yoshimura M., Yasue H., Nakayama M. et al. Genetic risk factors for coronary artery spasm: significance of endothelial nitric oxide synthase gene T-786→C and missense Glu298Asp variants // *J. Investig. Med.* – 2000. – **48**, № 5. – P.367–374.

Ін-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ

Матеріал надійшов до редакції 10.01.2005