

Бушман Я.Р., Данилко К.В.

## **ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ И НАСЛЕДОВАНИЯ АЛЛЕЛЕЙ ГЕНА НЕЙРОПИЛИН-1 (NRP1) В БАШКОРТОСТАНЕ**

**Научный руководитель – д.б.н., профессор Горбунова В.Ю.**

*Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа*

В данной статье описываются функции и значение гена нейропилин-1, который кодирует одноименный трансмембранный белок; влияние полиморфизмов гена на развитие различных заболеваний, в частности влияние белка NRP1 на вероятность заражения COVID-19. Изучена генетическая структура популяции в Башкортостане по данному гену и на основании этого рассмотрены эпидемиологические тенденции распределения данного гена в мире.

**Ключевые слова:** нейропилин-1, COVID-19, генетическая структура популяции, полиморфизм.

Bushman Y.R., Danilko K.V.

## **POPULATION GENETIC STUDY OF THE DISTRIBUTION AND INHERITANCE OF NEUROPIILIN-1 (NRP1) GENE ALLELES IN BASHKORTOSTAN**

**Scientific Advisor – Ph. D. in Biology, professor Gorbunova V.Y.**

*Bashkir state medical university, Ufa*

This article describes the functions and significance of the neuropilin-1 gene, which encodes the transmembrane protein of the same name; the influence of gene polymorphisms on the development of various diseases, in particular the influence of the NRP1 protein on the likelihood of infection with COVID-19. The genetic structure of the population in Bashkortostan for this gene was studied and, on the basis of this, the epidemiological trends in the distribution of this gene in the world were considered.

**Keywords:** neuropilin-1, COVID-19, genetic structure of the population, polymorphism.

Важно понять функционирование трансмембранного фактора при различных патологических состояниях, поскольку ген NRP1 связан с различными заболеваниями. Новизна данного исследования заключается в том, что оно является одним из первых в России и редким по всему миру.

### **Цель работы**

Изучить генетическую структуру популяции по гену NRP1 для анализа предрасположенности к респираторным заболеваниям.

### **Материал и методы**

С информированного согласия были взяты образцы буккального эпителия у 12 человек. Были проведены пробоподготовка, выделение ДНК с помощью набора готовых реактивов с очисткой на микроцентрифужных колонках и Real Time PCR.

### **Результаты и обсуждение**

Ген нейропилин-1 (NRP1) кодирует один из двух нейропилинов, которые содержат специфические белковые домены, позволяющие им участвовать в нескольких различных типах сигнальных путей, контролирующих клеточную подвижность. Нейропилин-1

участвует в ангиогенезе, в развитии нервной и сосудистой систем, играет роль в иммунном ответе и многих других процессах. [1,4]

Нейропилины содержат большой N-концевой внеклеточный домен, состоящий из доменов связывания комплемента, фактора свертывания крови V/VIII и меприна. Эти белки также содержат короткий трансмембранный домен и небольшой цитоплазматический домен. Нейропилины связывают многие лиганды и различные типы корцепторов (например, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и члены семейства семафоринов); они влияют на выживание клеток и клеточную подвижность. [2] Наиболее важной функцией рецептора NRP1 является его способность распознавать и связываться с пептидами по правилу C-конца (CendR), что облегчает проникновение и транспорт пептидов через ткани. [3]

Повышенная экспрессия NRP1 обнаружена в различных злокачественных опухолях. Белок участвует в васкуляризации и прогрессировании новообразований. [8] Также было установлено, что этот белок действует как корцептор SARS-CoV-2, вызывающий COVID-19, при инфицировании клеток-хозяев. [4,6]

С полиморфизмами данного гена связаны самые различные заболевания, представленные в таблице 1. Изменения в гене могут происходить как в интронной части, так и в некодирующей части последовательности. [1]

**Таблица 1**

**Полиморфизмы гена NRP1 и связанные с ними заболевания**

Однонуклеотидный полиморфизм	Мутация	Связанное заболевание	Генетическое происхождение	Предлагаемый механизм
rs2804495	G>T	Неоваскулярная возрастная макулярная дегенерация	Европейское	Интронная вариация
rs927099	T>C	Болезнь Альцгеймера с поздним началом	Европейское	Интронная вариация
rs1048804	A>G	Диабет 1-го типа	Европейское	Синонимичная мутация
rs10080	G>A	Риск тетрады Фалло	Восточноазиатское	Некодирующий транскрипт
rs1319013	T>G	Болезнь Альцгеймера с поздним началом	Европейское	Интронная вариация

rs1571781	A>G	Болезнь Альцгеймера с поздним началом	Европейское	Интронная вариация
rs2070296	C>T	Связан с худшей реакцией на лечение ранибизумабом при НВМД	Европейское	Синонимичная мутация
rs2506144	C>T	Нет связанных заболеваний	Европейское	Некодирующий транскрипт
rs1888686	T>C	Болезнь Альцгеймера с поздним началом	Европейское	Интронная вариация
rs12573218	C>T	Остеонекроз головки бедренной кости	Восточноазиатское	Интронная вариация
rs1010826	G>A	Диабет 1-го типа	Европейское	Интронная вариация
rs1331326	C>T	Болезнь Альцгеймера с поздним началом	Европейское	Интронная вариация
rs1888685	C>T	Болезнь Альцгеймера с поздним началом	Европейское	Интронная вариация
rs12358370	C>G	Остеонекроз головки бедренной кости	Восточноазиатское	Интронная вариация
rs2228638	C>T	Риск тетрады Фалло	Восточноазиатское	Миссенс-мутация

На данный момент известны четыре основных белка-рецептора, способствующие проникновению SARS-CoV-2 внутрь клетки – ACE2, TMPRSS2, CD147 и NRP1. [1]

Прикрепление и проникновение SARS-CoV-2 в клетки хозяина происходит благодаря наличию у вируса S-белка (Spike 1), который взаимодействует с внеклеточным доменом белка ACE2. Сериновая протеаза TMPRSS2 играет ключевую роль в подготовке шиповидного белка SARS-CoV-2 к взаимодействию с ACE2. S-белок расщепляется

ферментом клетки-хозяина – фурином и формируется С-концевая многоосновная последовательность Arg-Arg-Ala-Arg. Данная последовательность связывается с рецептором NRP1, и вирус проникает в клетку хозяина. [1, 2,10]

CD147 (BSG) является дополнительным корецептором вируса SARS-CoV-2 в эпителиальных клетках бронхов человека. [1]

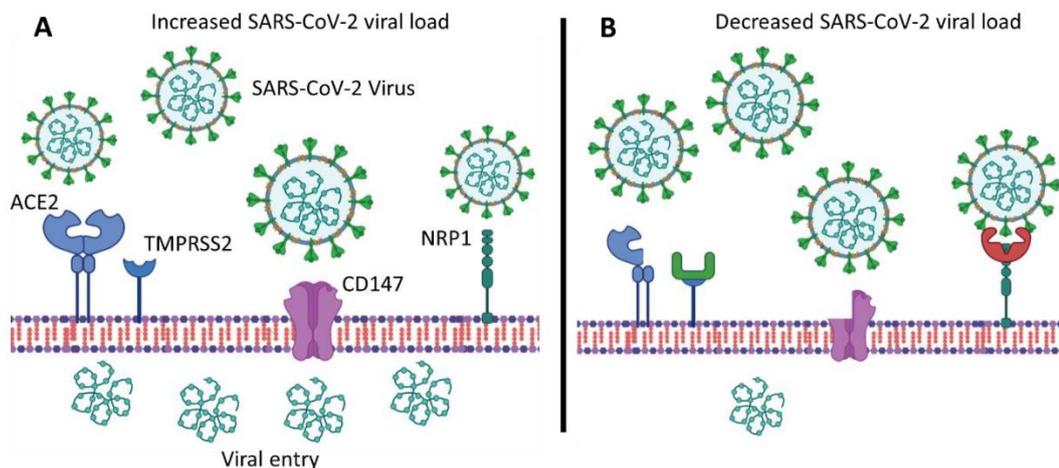


Рис. 1. Проникновение вируса SARS-CoV-2 в клетку

Вариабельность, наблюдаемая в этих генах, может влиять на тяжесть заболевания COVID-19. Различия в тяжести заболевания COVID-19 наблюдались у разных людей, этнических групп и даже на разных континентах. Определенные аллели облегчают проникновение вируса и, таким образом, увеличивают вирусную нагрузку (A), в то время как другие нарушают функцию белка и уменьшают проникновение вируса в клетку, что приводит к снижению вирусной нагрузки (B). [1]

Многие, переболевшие COVID-19, переболели без симптомов или с незначительными симптомами, такими как недомогание, респираторные нарушения, кашель, одышка, боль в груди, заложенность носа, головная боль, насморк, диарея. Однако у некоторых людей заболевание сопровождалось серьезными осложнениями, такими как пневмония, острый респираторный дистресс-синдром, отек легких, сепсис и даже смерть. [2]

NRP1 широко распространен в респираторном и обонятельном эпителии, он экспрессируется почти во всех видах клеток обонятельных ходов и даже в обонятельных нейронах. Это может объяснить высокую инфекционность вируса SARS-CoV-2 в этих типах клеток и попадание вируса в ЦНС через обонятельные луковицы, что вызывает частичную или полную потерю обоняния и вкуса. [2]

Наиболее высокий уровень заболеваемости и высокая смертность от COVID-19 наблюдается среди пожилых людей и пациентов с тяжелыми хроническими заболеваниями,

такими как диабет, ожирение и сердечно-сосудистые заболевания. Предполагается, что сложное протекание заболевания и смертность от COVID-19 при коморбидных состояниях связано с высоким уровнем экспрессии NRP1, но для подтверждения или опровержения этого необходимы дальнейшие исследования. [1,3,5]

Нами были собраны 12 образцов буккального эпителия у нескольких членов семьи (всего было взято 4 семьи) и выделена ДНК с помощью готового набора реактивов с очисткой на микроцентрифужных колонках, затем поставлена Real Time PCR на определение нейропилина-1, полиморфизма rs2804495. С помощью программы StepOne построили графики экспрессии гена в каждом из образцов. Графики представлены на рисунках 2 и 3. Аллель G подкрашена красителем VIC, аллель T подкрашена красителем FAM. По полученным результатам были определены генотипы каждого образца и составлены родословные. Результаты представлены на рисунке 4.

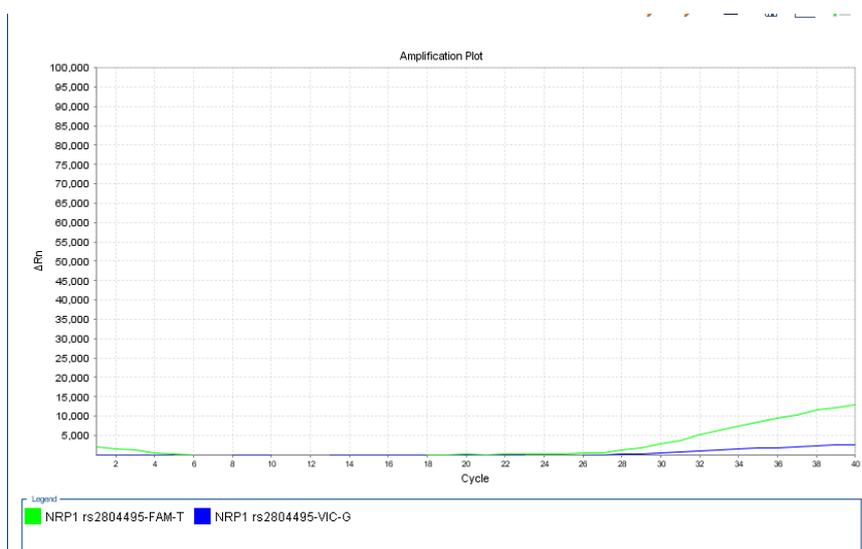


Рис. 2. Генотип GT

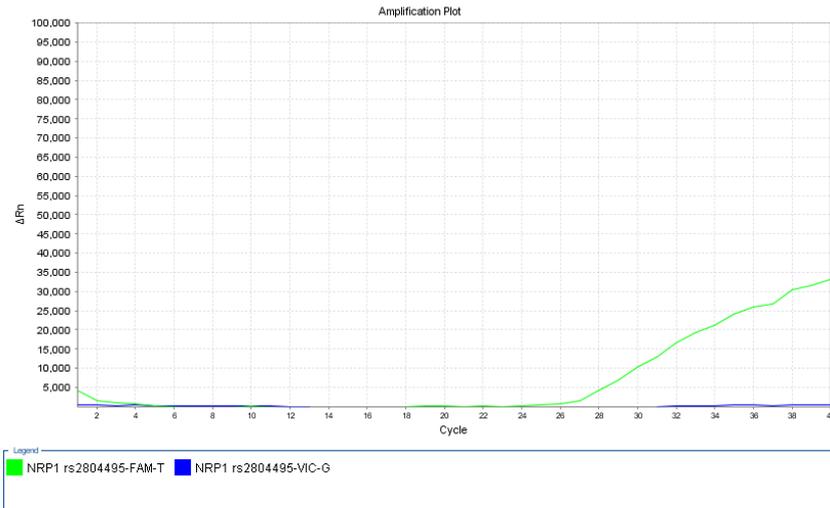


Рис. 2. Генотип ТТ

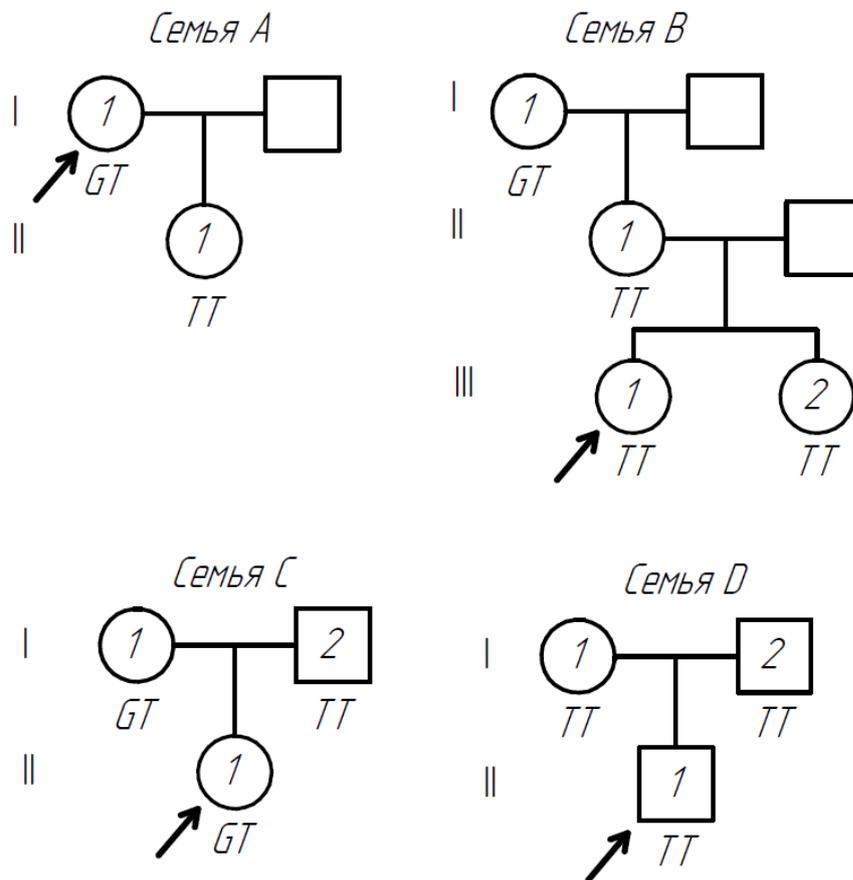


Рис. 3. Родословные

По полученным результатам видно, что наиболее часто встречающимся генотипом в данной выборке является генотип ТТ, GT встречается редко, GG не встречается вообще, при этом G является доминантным аллелем, а Т – рецессивным. Рассмотрим генетическую

структуру популяции, рассчитав частоты аллелей и генотипов по закону Харди-Вайнберга через частоту генотипа ТТ. Результаты расчетов приведены в таблице 2.

$$p + q = 1;$$

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1,$$

где  $p$  – это частота доминантного аллеля G,

$q$  – частота рецессивного аллеля T.

$$N_{\text{общ}} = 12; N_{\text{ТТ}} = 8;$$

$$q^2 = 0,67; q = \sqrt{0,67} = 0,82$$

$$p = 1 - q = 1 - 0,82 = 0,18;$$

$$0,18^2 + 2 \times 0,18 \times 0,82 + 0,82^2 = 1;$$

$$0,0324 + 0,2952 + 0,6724 = 1;$$

**Таблица 2**

**Результаты расчетов частоты генотипов по закону Харди-Вайнберга**

Генотип	Обозначение	Частота, %
GG	$p^2$	3,24
GT	$2pq$	29,52
TT	$q^2$	67,24

Сравним наши результаты с частотами генотипов полиморфизма rs2804495 по данным из электронной библиотеки SNPedia [7]. **Рис.** частот представлена на рисунке 3.

Полученные нами результаты наиболее близки по значениям к резидентам северо-восточного европейского происхождения и восточноазиатского происхождения.

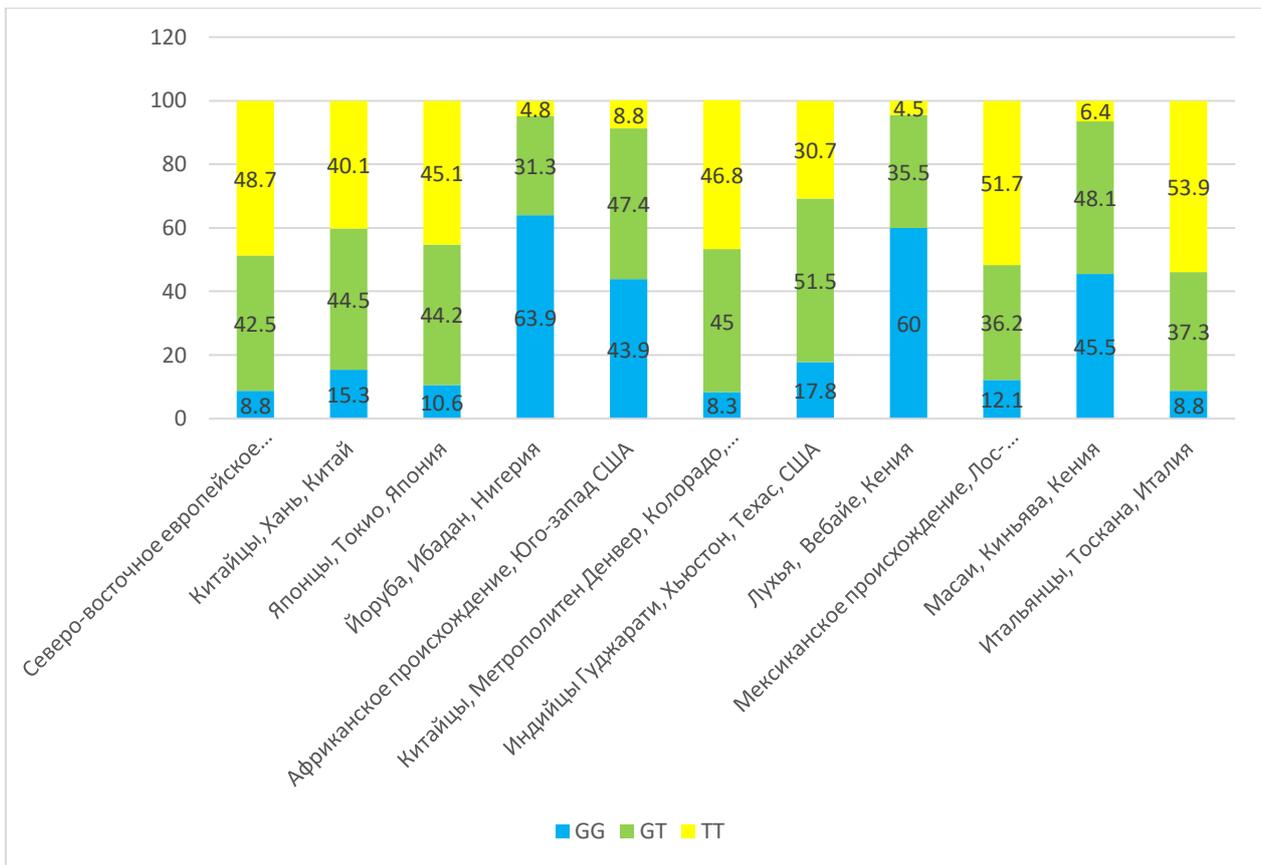


Рис. 4 - Частота генотипов по гену NRP 1 (rs2804495) по миру

Согласно статистике, приведенной Русской Службой BBC News (источник: Университет Джонса Хопкинса (Балтимор, США) и представленной на рисунке 6, наиболее высокий уровень заболеваемости COVID-19 наблюдался на всех континентах, кроме Австралии и Африки. [9]

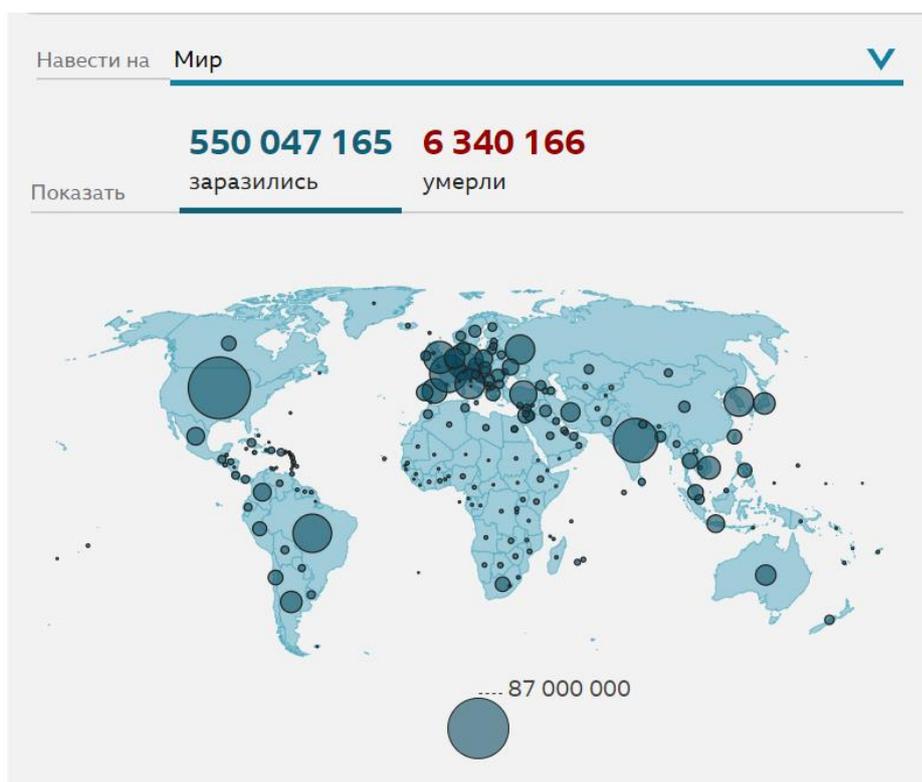


Рис. 5 - Статистика заболеваемости COVID-19 в мире. Последнее обновление - 5 июля 2022 года.

По графику частот генотипов видно, что преобладающим генотипом на африканском континенте является генотип GG, где оба аллеля доминантные. Можно предположить, что высокая заболеваемость COVID-19 связана с генотипами GT и TT, которые, в основном, свойственны европейцам и азиатам.

### Заключение и выводы

В заключение стоит отметить, что значение гена NRP1 и его полиморфизмов очень велико потому, что каждый полиморфизм связан с каким-либо заболеванием. Также NRP1 может стать терапевтической мишенью и при профилактике COVID-19, так как ингибирование взаимодействия С-последовательности с S-белком вируса снижает интенсивность проникновения SARS-CoV-2 в клетку хозяина.

Изучена генетическая структура популяции: преобладающим генотипом является TT (67,24%), генотипы GT и GG встречаются реже (29,52% и 3,24% соответственно). В семье А пробанд гетерозиготен, а II.1 – гомозиготен. В семье В генотип GT встречается только в первом поколении, во втором и третьем – генотип TT. В семье С генотип GT встречается и в первом, и во втором поколении. В семье D все гомозиготны и имеют генотип TT. Также, на основании полученных данных можно сделать вывод, что неопределенные генотипы тоже представляют собой либо GT, либо TT, таким образом, генотип GG в данной выборке не

встречается нигде. Предполагается, что люди с аллелем Т более подвержены риску заболевания COVID-19.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Коронавирус в мире: данные по странам и регионам. BBC News Русская Служба. [Электронный ресурс] URL: <https://www.bbc.com/russian/news-51706538>
2. Маркелов, В. А. Роль нейропилина-1 (NRP1) в развитии инфекции SARS-CoV-2 / В. А. Маркелов, К. В. Данилко // Якутский медицинский журнал. – 2022. – № 4(80). – С. 100-103. – DOI 10.25789/YMJ.2022.80.26..
3. Adimulam, T.; Arumugam, T.; Gokul, A.; Ramsuran, V. Genetic Variants within SARS-CoV-2 Human Receptor Genes May Contribute to Variable Disease Outcomes in Different Ethnicities. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 8711.
4. Chekol Abebe E, Mengie Ayele T, Tilahun Muche Z, Asmamaw Dejenie T. Neuropilin 1: A Novel Entry Factor for SARS-CoV-2 Infection and a Potential Therapeutic Target. *Biologics.* 2021;15:143-152
5. Fan SH, Shen ZY, Xiao YM. Functional polymorphisms of the neuropilin 1 gene are associated with the risk of tetralogy of Fallot in a Chinese Han population. *Gene.* 2018 May 5;653:72-79. doi: 10.1016/j.gene.2018.02.027. Epub 2018 Feb 10. PMID: 29432830.
6. James L. Daly, Boris Simonetti, Katja Klein et al. Neuropilin-1 is a host factor for SARS-CoV-2 infection. *Science* 20 Oct 2020: eabd3072 DOI: 10.1126/science.abd3072
7. Lorés-Motta, Laura; van Asten, Freek; Muether, Philipp S.d; Smailhodzic, Dzenita; Groenewoud, Joannes M.b; Omar, Amere; Chen, Johnf; Koenekoop, Robert K.g; Fauser, Saschad; Hoyng, Carel B.a; den Hollander, Anneke I.a,c; de Jong, Eiko K.a. A genetic variant in NRP1 is associated with worse response to ranibizumab treatment in neovascular age-related macular degeneration. *Pharmacogenetics and Genomics* 26(1):p 20-27, January 2016. | DOI: 10.1097/FPC.0000000000000180
8. Ludovico Cantuti-Castelvetri, Ravi Ojha, Liliana D. Pedro et al. Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity. *Science* 20 Oct 2020: eabd2985. DOI: 10.1126/science.abd2985
9. Rs2804495. SNPedia. [Электронный ресурс] URL: <https://www.snpedia.com/index.php/Rs2804495>
10. Soker, S.; Takashima, S.; Miao, H.Q.; Neufeld, G.; Klagsbrun, M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 1998, 92, 735–745.

#### *Сведения об авторах статьи:*

1. **Бушман Яна Робертовна** – студент-магистрант группы БМ-101.
2. **Данилко Ксения Владимировна** – к.б.н., доцент ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, с.н.с. ЦНИЛ ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России.