

Полиморфизм гена *TRPM8* в кыргызской популяции: возможная связь с высокогорной адаптацией

В.Н. Бабенко^{1,2}, Ж.Т. Исакова³, Э.Т. Талайбекова³, Д.А. Асамбаева³, В.Ф. Кобзев¹, Т.А. Потапова¹, М.И. Воевода^{1,4}, А.А. Алдашев³

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

³ Институт молекулярной биологии и медицины при Национальном центре кардиологии и терапии Министерства здравоохранения Кыргызской Республики, Бишкек, Кыргызская Республика

⁴ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины» Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Ген *TRPM8* кодирует рецептор, отвечающий за холодовую чувствительность организма, что предполагает его возможную роль в адаптации человека к холоду. В работе изучена структурная вариабельность гена *TRPM8* по пяти однонуклеотидным полиморфизмам (ОНП) в кыргызской популяции. Полиморфизмы локализованы в кодирующих участках гена, из них три ОНП расположены в интервале 20 п. н. седьмого экзона. Популяционные частоты минорных аллелей ОНП составили: rs13004520 G/C = 0,06; rs28901637 A/T = 0,13; rs11562975 G/C = 0,27; rs7593557 G/A = 0,21; rs11563071 C/G = 0,12. Проанализированная выборка кыргызов (275 человек) включает индивидов, проживающих на разной высоте над уровнем моря с резкими различиями климатических условий. Обнаружено, что у жителей высокогорья (более 2800 м н. у. м.) частота минорного аллеля rs11562975 была почти в полтора раза ниже ($p < 0,01$) по сравнению с жителями низкогогорья/среднегорья (760–2800 м н. у. м.). Полученные данные подтверждают возможное селективное значение полиморфизма rs11562975 в адаптации к холоду. Сравнение частот гаплотипов между популяциями кыргызов, европейцев, восточных азиатов и африканцев выявило резкое сужение их вариации у европейцев, возможно, связанное с сокращением численности популяции (бутылочное горлышко) в процессе эволюции. В работе рассмотрена экзон-интронная структура гена *TRPM8*. Проанализированы эпигенетические маркеры в районе гена *TRPM8*, найдены 2 сильных сайта связывания инсультаторных белков stcf, возможно, имеющих отношение к конформации хроматина и регуляции альтернативного сплайсинга. Дана структурно-функциональная характеристика генов семейства TRP белков.

Ключевые слова: ген *TRPM8*; популяционно-генетический анализ; однонуклеотидные полиморфизмы (ОНП); ассоциации; распределение; адаптация к холоду.

Polymorphism in the *TRPM8* gene in Kyrgyz population: putative association with highland adaptation

V.N. Babenko^{1,2}, Zh.T. Isakova³, E.T. Talaipekova³, D.A. Asambaeva³, V.F. Kobzev¹, T.A. Potapova¹, M.I. Voevoda^{1,4}, A.A. Aldashev³

¹ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Institute of Molecular Biology and Medicine, National Center for Cardiology and Therapy, Ministry of Health Care of the Kyrgyz Republic, Bishkek, Kyrgyz Republic

⁴ Institute of Internal and Preventive Medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russia

The human *TRPM8* gene encodes a receptor mediating cold sensitivity, and this fact points to its putative role in cold adaptation. The structural variability of the *TRPM8* gene for five single-nucleotide polymorphisms (SNPs) has been studied in Kyrgyz population. The SNPs are located in coding regions of the gene, and three of them are confined to a segment of 20 bp in exon 7. The frequencies of minor SNP alleles are: rs13004520 G/C = 0.06; rs28901637 A/T = 0.13; rs11562975 G/C = 0.27; rs7593557 G/A = 0.21; rs11563071 C/G = 0.12. The analyzed sample of Kyrgyz population includes 275 individuals living at different altitudes and under drastically different climatic conditions. The frequency of the minor rs11562975 allele in highlanders (living above 2800 m A. S. L.) is one-third lower than in residents of lower regions (760–2800 m A. S. L.; $p < 0.01$). This result presumes a selective role of rs11562975 in cold adaptation. Comparison of haplotype frequencies in Kyrgyz people with Europeans, East Asians, and Africans shows a clear narrowing of genotype variation in Europeans in comparison to all others. Probably, this phenomenon is related to a population size decline (bottleneck effect) during the evolution. We consider the exon–intron structure of the *TRPM8* gene. Epigenetic markers in the vicinity of the gene have been analyzed. Two strong binding sites for

insulator ctf proteins are present there. They are likely to be associated with chromatin conformation and alternative splicing regulation. A structure – functional characterization of genes for the TRP protein family is provided.

Keywords: *TRPM8* gene, population analysis, single-nucleotide polymorphisms, associations, distribution, cold adaptation.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Бабенко В.Н., Исакова Ж.Т., Талайбекова Э.Т., Асамбаева Д.А., Кобзев В.Ф., Потапова Т.А., Воевода М.И., Алдашев А.А. Полиморфизм гена *TRPM8* в кыргызской популяции: возможная связь с высокогорной адаптацией. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(5):630-637. DOI 10.18699/VJ15.080

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Babenko V.N., Isakova J.T., Talaipekova E.T., Asambaeva D.A., Kobzev V.F., Potapova T.A., Voevoda M.I. Aldashev A.A. Polymorphism in the *TRPM8* gene in Kyrgyz population: putative association with highland adaptation. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(5):630-637. DOI 10.18699/VJ15.080

Республика Кыргызстан находится в центре самого крупного в мире континента Евразии. Она расположена среди горных хребтов Тянь-Шаня и Памиро-Алая. Средняя высота территории республики составляет 2 630 м над уровнем моря (м н. у. м.). Около 93 % территории находится на высоте более 1 000 м н. у. м., примерно 42 % – выше 3 000 м н. у. м., 85 % территории Кыргызстана расположено выше 1 500 м н. у. м. На высоте более 2 000 м н. у. м. в Кыргызстане проживает 10 % населения (Агаджанян, Миррахимов, 1970; Миррахимов, 1978; Zheembaev et al., 2005).

На территории республики, в высокогорных районах Тянь-Шаня, погода имеет все признаки субполярного климата: зимы продолжительные и суровые, лето холодное и с заморозками. Среднеянварская температура в высокогорьях колеблется от -40°C до -50°C . Летом (июль) в высокогорных районах температура составляет плюс $5-11^{\circ}\text{C}$ (Zheembaev et al., 2005). Популяция кыргызов высокогорных регионов Тянь-Шаня и Памира приспособилась к сложным и меняющимся условиям субполярного климата.

В адаптации человека к низкой температуре окружающей среды важную роль играют холодовые рецепторы (Козырева и др., 2011а; Козырева, Воронова, 2014).

Некоторые члены TRP семейства, относящиеся к Ca^{2+} -проницаемым каналам, функционируют в качестве своеобразных детекторов температурных стимулов (McKemy, 2002; Ramsey et al., 2006). Ген *TRPM8* кодирует субъединицу неселективного кальциевого канала меластатинового подсемейства TRP белков. (Ramsey et al., 2006). Канал TRPM8 является гомотетрамером, сформированным из идентичных белковых субъединиц (длиной в 1 104 аминокислоты), содержащих шесть трансмембранных сегментов (S1–S6) и цитоплазматические аминный и карбоксильный домены. Пятый и шестой трансмембранные сегменты и внешние петли между ними образуют пору канала (Ramsey et al., 2006; Latorge et al., 2011). Канал TRPM8 экспрессируется в клетках сенсорных нейронов, активируется низкой температурой и химическими агентами (ментол, ицилин) (McKemy, 2002; Kim et al., 2014). Механизм действия канала TRPM8 опосредован ионами кальция. Активация канала холодом приводит к открытию поры и поступлению катионов в клетку, что вызывает де-

поляризацию мембраны и создание активного потенциала действия. Белок TRPM8 также экспрессируется в эпителии простаты, легких, селезенки, где его возможная функция – поддержание кальциевого гомеостаза в клетке (Zhang, Barritt, 2006).

Изучение роли гена *TRPM8* в термосенсорике молекулярно-генетическими методами позволило выявить у него несколько мутаций, которые проявляют ассоциации с определенными фенотипическими признаками. Так, индивиды, имеющие гомозиготный генотип GG однонуклеотидного полиморфизма (ОНП) rs11562975, оказались менее чувствительны к холоду, с адекватным ответом организма на охлаждение (уменьшение теплоотдачи с дыханием и переход на жировой обмен) (Козырева и др., 2011б, 2014). Ген *TRPM8* полифункционален и помимо термочувствительности вовлечен в регуляцию других физиологических процессов (Sabnis et al., 2008; Johnson et al., 2009), что подтверждают ассоциации между показателями липидного обмена и полиморфизмами гена, обнаруженные в популяциях русских и шорцев (Потапова и др., 2011, 2014).

Показано, что чукчи, относящиеся к арктическим монголоидам и проживающие в суровых условиях Крайнего Севера, отличаются от центральноазиатских популяций (тувинцы, казахи, шорцы, хакасы) по частотам аллелей и гаплотипов ОНП (rs28901637 и rs11562975) гена *TRPM8*, что может быть связано с их адаптацией к холоду (Потапова и др., 2008).

Цель работы – изучить частоты аллелей гена *TRPM8* по пяти ОНП (rs13004520 G/C, rs28901637A/T, rs11562975 G/C, rs7593557 G/A, rs11563071 C/G) в популяции кыргызов и оценить их распределение у индивидов, проживающих на разных высотах над уровнем моря. По изученным полиморфизмам дать оценку дивергенции между кыргызским этносом и популяциями европейцев, восточных азиатов и африканцев.

Материал и методы исследования

У 275 этнических кыргызов было проведено генотипирование 5 однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) гена *TRPM8*. Обследованы территориально дистанцированные группы жителей низкогорья (г. Бишкек, 760 м н. у. м.), где климат континентальный сухой, лето жаркое, а зима

Таблица 1. Характеристика выборок кыргызов ($n = 275$)

| Выборки | Высота над уровнем моря, м | Число индивидов, n |
|-----------------------|----------------------------|----------------------|
| Низкогорье, г. Бишкек | 760 | 37 |
| Среднегорье | 1 600–2 500 | 119 |
| Высокогорье | 2 800–3 600 | 119 |

Таблица 2. Однонуклеотидные полиморфизмы гена *TRPM8*

| ОНП | Экзон | Замена нуклеотида | Замена аминокислоты |
|-------------------|-------|-------------------|---------------------|
| rs13004520 | 7 | G → C | Arg → Thr |
| rs28901637 | 7 | A → T | Pro → Pro |
| rs11562975 | 7 | G → C | Leu → Leu |
| rs17868387 | 7 | A → G | Tyr → Cys |
| rs7593557 | 11 | G → A | Ser → Asn |
| rs11563071 | 23 | C → G | Val → Val |

умеренно холодная (средняя температура января -7°C). В исследование также были включены жители среднегорья Иссык-Кульской и Нарынской областей (1 600–2 500 м н. у. м.), где климат резко континентальный, с холодной, почти бесснежной зимой (средняя температура января от -15 до -18°C) и относительно прохладным летом. Основную группу в исследовании составили жители высокогорья села Ак-Шыйрак Джети-Огузского района Иссык-Кульской области ($42^{\circ}18'35''$ с. ш. и $77^{\circ}53'08''$ в. д.); села Арчалы Тонского района Иссык-Кульской области ($42^{\circ}06'36''$ с. ш. и $76^{\circ}59'24''$ в. д.); высокогорных долин Ак-Сай и Арпа Нарынской области; села Мургаб Таджикистана ($38^{\circ}10'08''$ с. ш. и $73^{\circ}57'54''$ в. д.; 2 800–3 600 м н. у. м.), где климат континентальный, зима холодная и продолжительная (средняя январская температура составляет минус $50-60^{\circ}\text{C}$). В табл. 1 представлены данные исследованных групп.

Популяции

Для сравнения с другими выборками мы воспользовались базой данных «1 000 геномов» (1000genomes.org) и скомпилировали частоты референсных полиморфизмов 3 векторных популяций: европейцев (итальянцы, испанцы, англичане – 365 индивидов), восточных азиатов (китайцы из двух провинций – 100 и 97 индивидов; японцы – 89 индивидов) и африканцев (нигерийцы, кенийцы, гамбийцы – 185 индивидов).

Полиморфизмы

Описание изученных ОНП дано в табл. 2. Все ОНП находятся в кодирующих участках гена *TRPM8*. Четыре ОНП расположены в интервале 20 п. н. седьмого экзона, а два других – в одиннадцатом (rs7593557) и двадцать третьем (rs11563071) экзонах. Данные участки гена кодируют аминный (экзоны 7 и 11) и карбоксильный (экзон 23) домены белка TRPM8.

Выделенным шрифтом в табл. 2 указаны два сцепленных ($r^2 = 0,95$) компенсаторных ОНП, rs13004520 и rs17868387, находящихся на расстоянии 12 п. н. друг от друга. Оба расположены в экзоне 7. Из-за высокой степени их сцепления для дальнейшего анализа был оставлен только один из них (rs13004520). Мы остановили свой выбор на двух несинонимичных и трех синонимичных заменах в гене *TRPM8*. Заметим, что практически все взятые в анализ полиморфизмы – трансверсии, кроме ОНП rs7593557.

Молекулярно-генетические методы исследования

Геномную ДНК из образцов крови выделяли стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции (Maniatis et al., 1982). Анализ выявленных полиморфизмов проводили с помощью аллель-специфической ПЦР. В табл. 3 указаны праймеры и параметры ПЦР, описанные ранее (Потапова и др. 2011, 2014).

Условия аллель-специфических ПЦР были следующими: денатурация при 95°C 1 мин, отжиг 1 мин (температура отжига для каждого ОНП указана в табл. 3), синтез при 72°C 1 мин – 30 циклов. Амплификационная смесь в объеме 25 мкл содержала 75 mM трис-HCl (pH 9,0), 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,01 % Tween-20, MgCl_2 (концентрация – в табл. 3), 0,2 mM каждого dNTP, 0,5 мкМ каждого из праймеров, 1,25 ед. Taq-полимеразы и 0,5 мкг геномной ДНК.

Продукты аллель-специфических ПЦР оценивали электрофорезом в 3 %-м агарозном геле, окрашивание проводили бромистым этидием и визуализировали геле-документирующей системой GelDoc IT («UVP», Великобритания).

Статистические методы

Межпопуляционные различия оценивали по дистанции Fst (Slatkin, 1994) с помощью программы Arlequin v.3.5.1.2.

Таблица 3. Структура праймеров и некоторые параметры ПЦР

| Идентификационный номер ОНП | Праймеры | Длина фрагмента, п. н. | Температура отжига, °С | Концентрация MgCl ₂ , mM | |
|-----------------------------|----------|--|------------------------|-------------------------------------|-----|
| rs13004520 | прямой | 5'-tgtaccttatggatgacttcacgag-3' 5'-tgtaccttatggatgacttcacgac-3' | 210 | 60 | 1,8 |
| | обратный | 5'-ggctgctgtggttattgtacacttc-3' | | | |
| rs28901637 | прямой | 5'-ccgatgacttcacaagagataca-3' 5'-ccgatgacttcacaagagatact-3' | 161 | 57 | 1,5 |
| | обратный | 5'-ccctaaccactgaccttgaata-3' | | | |
| rs11562975 | прямой | 5'-atataggattctggaggaggcat-3' | 207 | 60 | 2,5 |
| | обратный | 5'-tttggtgtgttctcaggatattc-3' 5'-tttggtgtgttctcaggatattg-3' | | | |
| rs7593557 | прямой | 5'-ctctcacagccttcagaccag-3' 5'-ctctcacagccttcagaccacaa-3' | 182 | 69 | 1,8 |
| | обратный | 5'-cagaccacagtcagaccacaa-3' | | | |
| rs11563071 | прямой | 5'-actctggcatggagggtttc-3' 5'-actctggcatggagggtttg-3' | 218 | 60 | 1,8 |
| | обратный | 5'-tgcccgggtaatatcttgtgg-3' | | | |

Уровень значимости дистанций *Fst* оценивали стохастически, число перестановок – 10 000, уровень значимости $p = 0,001$. Для проверки отклонения распределения частот генотипов от ожидаемого (Харди – Вайнберга) использовали точный критерий Фишера с оценкой величины достоверности по методу Монте Карло. Число шагов Марковской цепи – 1 000 000, число обнулений состояния памяти – 100 000 (Arlequin v3.5.1.2; Excoffier et al., 2005). Многомерное шкалирование было произведено с помощью программы XLStat (www.xlstat.com) на основе матрицы попарных различий *Fst*.

Результаты и обсуждение

Семейство генов TRP

Ген *TRPM8* кодирует неселективные катионные каналы меластатинового (M) подсемейства TRP белков. Кроме подсемейства M существуют как минимум еще три подсемейства с более чем одним паралогом (TRPC, TRPM, TRPV), а также одиночные семейства TRPA1, TRPT1, TRPS1. Все они, кроме TRPA1, продуцируют альтернативные транскрипты (табл. 4) и имеют медианную длину более 60 кб.

Экзон-интронная структура TRP

Как видно из рис. 1, длина транскрипта статистически слабо связана с числом экзонов, что характерно для тканеспецифических генов, расположенных в гетерохроматиновых районах. Ген *TRPT1*, самый короткий ген семейства TRP, имеет от 7 до 8 экзонов и 6 альтернативных транскриптов (табл. 4). Это единственный ген семейства, не относящийся к тканеспецифическим. Он располагается в эухроматине и экспрессируется в большинстве клеточных линий. Признаком широко экспрессирующегося гена является и его CG-богатый промотор.

Рассматривая структуру и хроматиновый контекст гена *TRPM8*, заметим, что это протяженный ген с медианным числом экзонов, равным 22 (от 4 до 27), вычисленным по 5 аннотированным изоформам. Он имеет в своем составе два сильных сайта связывания инсулятора *ctcf*, работающих в большинстве клеточных линий. Эти сайты могут иметь отношение как к тканеспецифической конформации хроматина, подавляющей экспрессию *TRPM8*, так и регуляции альтернативного сплайсинга этого гена (например, экспрессия 3'-локализованной короткой изоформы BC033137, 8 экзонов). Кроме сильных сайтов связывания *ctcf* имеются тканеспецифические, присутствующие в небольшом числе клеточных линий, но также влияющие на альтернативный сплайсинг, в частности экспрессию 5'-локализованной короткой изоформы (AY532375, 4 экзона).

Хотя целью данной работы было исследование распределения частот аллелей ОНП гена *TRPM8* в популяции кыргызов по сравнению с другими популяциями, предполагается, что анализ полиморфизмов в сайтах связывания транскрипционных факторов, в частности CTCF, и учет распределения частот изоформ в различных тканях для выявления специфики функционирования гена будут также актуальны.

Структура гена TRPM8 по 5 полиморфизмам в популяциях

В табл. 5 приведены частоты минорных аллелей в изученных популяциях, особенности распределения которых рассмотрены далее. Невысокие частотные значения обнаружены по минорному С-аллелю rs13004520, который приводит к изменению аминокислоты Arg/Thr в белке. В кыргызской популяции частоты минорных аллелей ОНП rs28901637 и rs11563071 имели близкие значения, сопоставимые с таковыми восточных азиатов, в то время

Таблица 4. Классификация генов семейства TRP, их хромосомная локализация, длина и число альтернативных транскриптов

| Семейство | Ген | Хромосома | Длина, п. н. | Число изоформ |
|-----------|----------------|-----------|--------------|---------------|
| TRPA | <i>TRPA1</i> | chr8 | 54 334 | 1 |
| TRPC | <i>TRPC2</i> | chr11 | 132 365 | 4 |
| TRPC | <i>TRPC4</i> | chr13 | 233 167 | 7 |
| TRPC | <i>TRPC1</i> | chr3 | 83 464 | 3 |
| TRPC | <i>TRPC3</i> | chr4 | 72 727 | 4 |
| TRPC | <i>TRPC7</i> | chr5 | 152 166 | 6 |
| TRPC | <i>TRPC5</i> | chrX | 308 463 | 2 |
| TRPC | <i>TRPC4AP</i> | chr20 | 90 412 | 7 |
| TRPM | <i>TRPM5</i> | chr11 | 18 530 | 3 |
| TRPM | <i>TRPM1</i> | chr15 | 160 213 | 11 |
| TRPM | <i>TRPM4</i> | chr19 | 54 083 | 7 |
| TRPM | <i>TRPM8</i> | chr2 | 102 124 | 5 |
| TRPM | <i>TRPM2</i> | chr21 | 92 919 | 9 |
| TRPM | <i>TRPM3</i> | chr9 | 622 461 | 24 |
| TRPS | <i>TRPS1</i> | chr8 | 260 505 | 4 |
| TRPT | <i>TRPT1</i> | chr11 | 2 456 | 6 |
| TRPV | <i>TRPV4</i> | chr12 | 50 321 | 6 |
| TRPV | <i>TRPV3</i> | chr17 | 44 804 | 20 |
| TRPV | <i>TRPV6</i> | chr7 | 25 173 | 5 |

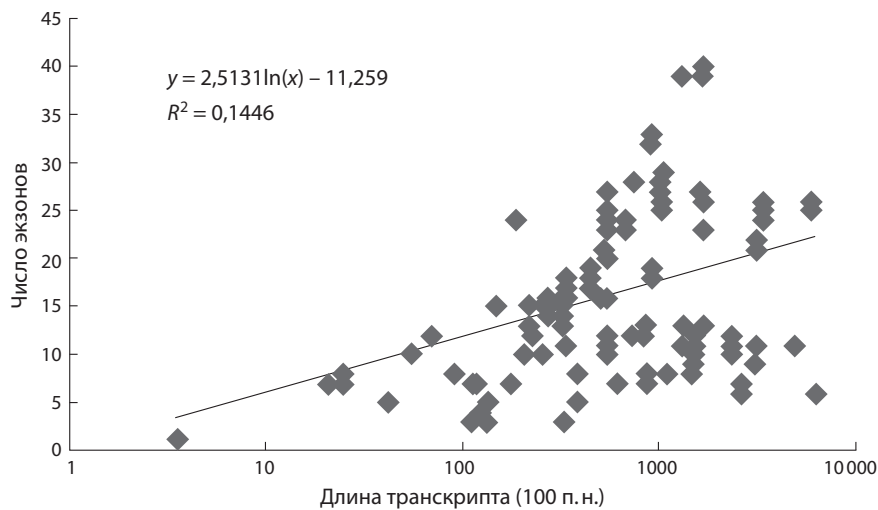


Рис. 1. Зависимость длины транскриптов от числа экзонов генов семейства TRP.

Таблица 5. Частоты минорных аллелей изученных ОНП гена *TRPM8* в популяциях

| ОНП | Африканцы | Европейцы | Восточные азиаты | Кыргызы |
|------------|-----------|-----------|------------------|---------|
| rs13004520 | 0,003 | 0,040 | 0,07 | 0,06 |
| rs28901637 | 0,059 | 0,0068 | 0,17 | 0,13 |
| rs11562975 | 0,024 | 0,0849 | 0,20 | 0,27 |
| rs7593557 | 0,354 | 0,0534 | 0,43 | 0,21 |
| rs11563071 | 0,176 | 0,0849 | 0,11 | 0,12 |

Таблица 6. Матрица попарных расстояний (*Fst*), вычисленная по пяти ОНП гена *TRPM8* для 4 анализируемых популяций

| Популяции | Африканцы | Восточные азиаты | Европейцы | Кыргызы |
|------------------|-----------|------------------|-----------|---------|
| Негроиды | 0 | 0,05 | 0,08 | 0,073 |
| Восточные азиаты | 0,05 | 0 | 0,11 | 0,02 |
| Европейцы | 0,083 | 0,11 | 0 | 0,068 |
| Кыргызы | 0,073 | 0,02 | 0,068 | 0 |

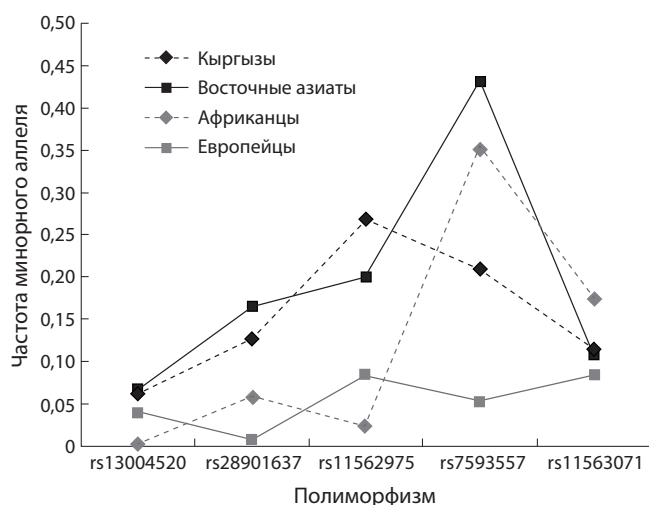


Рис. 2. Частоты минорных аллелей ОНП в популяциях.

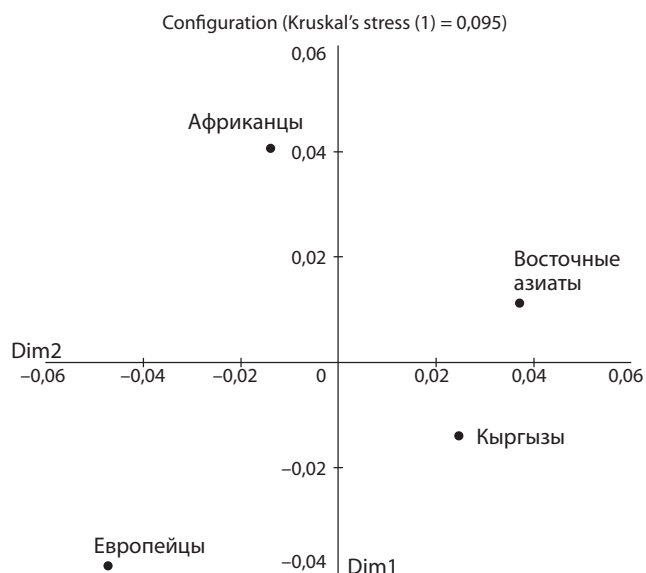


Рис. 3. График многомерного шкалирования, построенный по данным 5 локусов гена *TRPM8*.

как у европейцев Т-аллель (rs28901637) практически отсутствовал (рис. 2). Частоты минорных аллелей rs11562975 и rs7593557 (*Ser/Asn*) почти в два раза превышали таковые других ОНП кыргызов. Высокие частотные значения аллелей этих ОНП наблюдали у восточных азиатов. Заметим, что частота А-аллеля rs7593557 у восточных азиатов приближалась к 0,5 и была высокой у африканцев (табл. 5). Следует также отметить, что частоты минорных аллелей изученных ОНП европейцев не превышают 0,1.

Мы оценили частоты полиморфизмов по четырем популяциям и построили матрицу попарных различий *Fst* (табл. 6). Выяснилось, что 4 рассмотренные популяции достоверно различаются между собой по распределению частот пяти полиморфизмов (рис. 3) при уровне значимости $p < 10^{-5}$.

Гаплотипическая структура гена *TRPM8*

При анализе попарного сцепления пяти полиморфизмов выяснилось, что три базовые популяции кардинально отличаются друг от друга:

1. Африканская популяция имеет два ОНП (rs11562975 и rs7593557), у которых сцепление между аллеля достоверно.
2. Восточноазиатская популяция имеет плотно сцепленные аллели 4 ОНП, за исключением rs11563071.
3. В европейской популяции не обнаружено сцепление между аллелями rs11562975 и аллелями других ОНП.

4. Кыргызская популяция по профилю сцепленных аллелей ОНП близка к восточным азиатам.

Данные особенности отражены в графике многомерного шкалирования (рис. 3), построенном по матрице *Fst* (табл. 6). Все попарные различия *Fst* высоко достоверны ($p < 10^{-5}$).

На рис. 4 представлено распределение частот гаплотипов по изученным ОНП. Европейская популяция имеет один резко выраженный гаплотип, GAGGC, содержащий распространенные аллели ОНП. В других популяциях он также преобладал и составлял половину всех гаплотипов. Частоты остальных вариантов, за исключением одного–двух в популяции, были невысокие. Так, у кыргызов вторым по представленности был вариант GACGC (0,16) с заменой в третьей позиции относительно основного гаплотипа (GAGGC). У восточных азиатов его частота составила 0,09, более распространен был вариант GAGAC (0,15) с заменой в четвертой позиции. У африканцев данный вариант является наиболее распространенным (0,23) после основного гаплотипа. Сравнительный анализ частот мажорных генотипов показал резкое отличие европейцев от остальных популяций, возможно, связанное с сокращением численности популяции (бутылочное горлышко) в процессе эволюции.

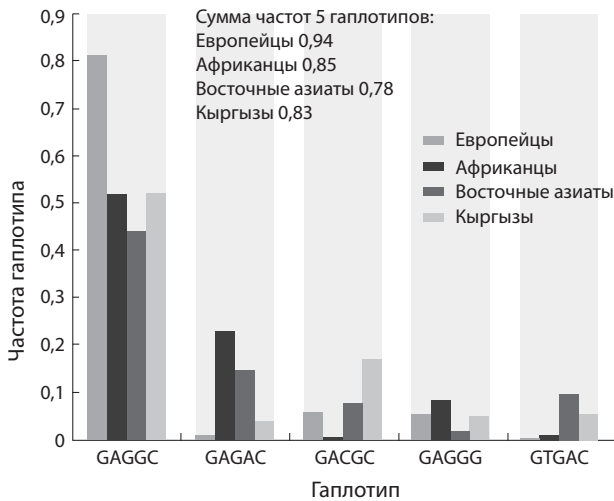


Рис. 4. Частоты мажорных гаплотипов в популяциях.

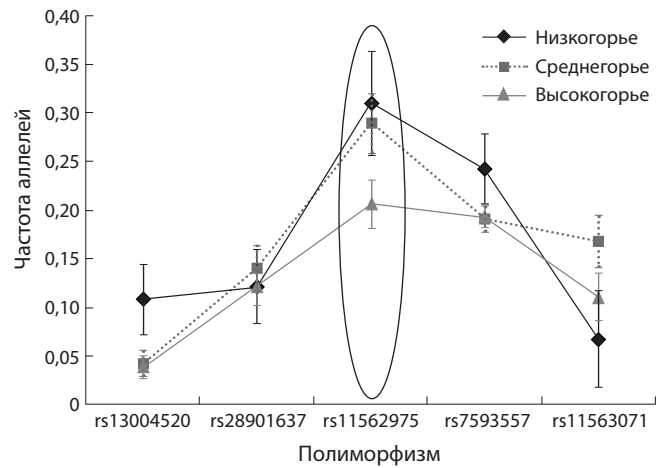


Рис. 5. Частоты минорных аллелей ОНП в разных «высотных» группах.

Даны стандартные отклонения в каждой точке. Полиморфизм с достоверно отличающимися частотами обведен.

Таблица 7. Сравнение частот генотипов и аллелей rs11562975 гена *TRPM8* у жителей, проживающих на разных высотах

| Генотипы, аллели | Высота над уровнем моря, м | | χ^2/p |
|------------------|----------------------------|-----------------------|-------------|
| | 760–2 800 (n = 156) | Более 2 800 (n = 119) | |
| GG | 0,54 (75) | 0,63 (82) | 4,67/0,07 |
| GC | 0,38 (53) | 0,34 (45) | |
| CC | 0,08 (12) | 0,3 (4) | |
| G | 0,73 (203) | 0,80 (209) | 8,21/0,003* |
| C | 0,27 (77) | 0,20 (53) | |

* $p < 0,05$. В скобках дано n – число индивидов.

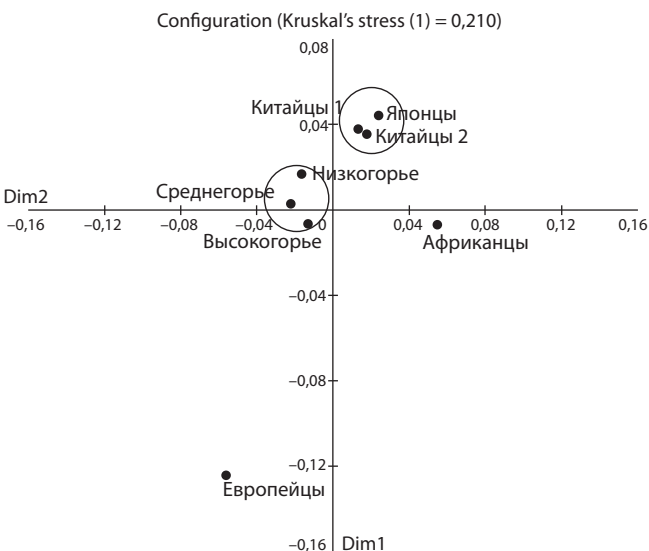


Рис. 6. График многомерного шкалирования, построенный на основе матрицы попарной гетерогенности F_{st} .

Недостоверно различающиеся популяции обведены овалом. В ином случае популяции различаются с вероятностью $p < 10^{-5}$ (рис. 3).

Генетические различия популяции кыргызов в зависимости от высоты их проживания

Достоверные различия по частотам минорного аллеля rs11562975 выявлены между жителями высокогорья, с одной стороны, и среднегорья и низкогогорья, с другой (рис. 5). Среднегорье в данном случае представлено жителями Иссык-Кульской области (92 человека, 1 600–2 700 м н. у. м.). В табл. 7 приведено сравнение частот генотипов и аллелей rs11562975 между жителями высокогорья и среднегорья/низкогогорья, сгруппированными на основании табл. 2. Жители высокогорья имели более низкие частоты минорного аллеля этого ОНП ($p < 0,003$). Полученные результаты согласуются с данными Козыревой с коллегами (2011б; 2014). Выяснилось, что кыргызы, проживающие в среднегорье и высокогорье, более удалены от восточно-азиатских популяций (китацев и японцев) по сравнению с низкогогорьем (рис. 6).

Выводы

1. В работе подтвердилась обнаруженная ранее (Козырева и др., 2011б, 2014) ассоциация ОНП rs11562975 гена *TRPM8* с чувствительностью к холоду. Показано, что у жителей высокогорья (более 2 800 м н. у. м.) частота минорного аллеля rs11562975 была почти в полтора

- раза ниже ($p < 0,01$) по сравнению с жителями низкогорья/среднегорья (760–2800 м н. у. м.).
2. В контексте сравнения распределения частот аллелей изученных ОНП европейская популяция малоинформативна в силу крайне низких частот минорных аллелей.
 3. Кыргызская и восточноазиатская (китайцы и японцы) популяции достоверно различаются между собой по значениям *Fst*. Такое распределение между этими этносами, а также их сравнение с корневой популяцией африканцев могут говорить о достаточно долгой по времени дивергенции этих популяций или быстрой адаптивной динамике частот аллелей гена. По значениям *Fst* различия внутри популяции восточных азиатов и кыргызских групп недостоверны.

Благодарности

Работа поддержана грантом РФФИ № 15-54-53091 ГФЕН_а, а также Интеграционным проектом СО РАН. Часть вычислений проведена в Новосибирском суперкомпьютерном центре СО РАН (www.sccc.ru). Работа выполнена в рамках Договора о международном сотрудничестве Российской Федерации и Кыргызской Республики от 14.11. 2013 г.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Агаджанян Н.А., Миррахимов М.М. Горы и резистентность организма. М.: Наука, 1970.

Козырева Т.В., Воронова И.П. Вовлечение нейрогенного уровня регуляции в процессы поддержания температурного гомеостаза организма на холоде. Вавилов. журн. генет. и селекции. 2014;18(4):100-1109.

Козырева Т.В., Козарук В.П., Ткаченко Е.Я., Храмова Г.М. Влияние активации ионного канала TRPM8 на терморегуляторные реакции при охлаждении. Российский физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2011а;2:218-226.

Козырева Т.В., Ткаченко Е.Я., Потапова Т.А. Воевода М.И. Реакция респираторной системы на локальное охлаждение у людей с однонуклеотидным полиморфизмом rs11562975 гена термочувствительного ионного канала *TRPM8*. Физиол. человека. 2014; 40(2):94-98.

Козырева Т.В., Ткаченко Е.Я., Потапова Т.А. Ромашенко А.Г., Воевода М.И. Связь однонуклеотидного полиморфизма rs11562975 гена термочувствительного ионного канала TRPM8 с чувствительностью человека к холоду и ментолу. Физиол. человека. 2011б;37(2):71-76.

Миррахимов М.М. Человек и горы. М.: Знание, 1978.

Потапова Т.А., Бабенко В.Н., Кобзев В.Ф. Ромашенко А.Г., Максимова В.Н., Воевода М.И. Анализ ассоциаций однонуклеотидных полиморфизмов гена холодного рецептора TRPM8 с липидными показателями плазмы крови и антропометрическими параметрами у русских. Бюл. эксперим. биол. мед. 2014;157(5): 728-732.

Потапова Т.А., Юдин Н.С., Бабенко В.Н., Пилипенко И.В., Кобзев В.Ф., Григорьяк Л.А., Воевода М.И. Полиморфизм гена холодного рецептора TRPM8 в этнических группах Сибири и Дальнего Востока. Информ. вестн. ВОГиС. 2008;12:749-754.

Потапова Т.А., Юдин Н.С., Пилипенко И.В. Ассоциация полиморфизма гена холодного рецептора TRPM8 с липидными показателями крови и антропометрическими параметрами у шорцев. Бюл. эксперим. биол. мед. 2011;151(2):223-226.

Excoffier L., Laval G., Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics dataanalysis. *Evol. Bioinform. Online*. 2005;1:47-50.

Johnson C.D., Melanaphy D., Purse A., Stokesberry S.A., Dickson P., Zholos A.V. Transient receptor potential melastatin 8 channel involvement in the regulation of vascular tone. *J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2009;296:H1868-H1877.

Kim Y.S., Park J.H., Choi S.J., Bae J.Y., Ahn D.K., McKemy D.D., Bae Y.C. Central connectivity of transient receptor potential melastatin 8-expressing axons in the brain stem and spinal dorsal horn. *PLoS One*. 2014;9(4):e94080.

Latorre R., Brauchi S., Madrid R., Orio P. A cool channel in cold transduction. *Physiology*. 2011;26:273-285.

Maniatis T., Fritsch E.E., Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.

McKemy D.D., Neuhauser W.M., Jullius D. Identification of a cold receptor reveals general role for TRP channels in thermosensation. *Nature*. 2002;416:52-58.

Ramsey S., Delling M., Clapham D.E. An introduction to TRP channels. *Annu. Rev. Physiol.* 2006;68:619-647.

Sabnis A.S., Reilly C.A., Veranth J.M., Yost G.S. Increased transcription of cytokine genes in human lung epithelial cells through activation of a TRPM8 variant by cold temperatures. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2008;295:L194-L200.

Slatkin M. An exact test for neutrality based on the Ewens sampling distribution. *Genet. Res.* 1994;64(1):71-74. www.xlstat.com

Zhang L., Barritt G.J. TRPM8 in prostate cancer cells: a potential diagnostic and prognostic marker with a secretory function? *Endocrine-Related Cancer*. 2006;13:27-38.

Zheembaev Zh.Zh., Aldashev A., Merenkova L.P. Problem of mountainous countries. National Academy of Sciences of the Kyrgyz Republic (by the examples of Kyrgyzstan). Threats and challenges of modern times. NAS KR. Bishkek: Ilim. 2005.