

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної
біотехнології та біоінформатики
к.б.н, доц. О. Ю. Нипорко
Протокол №____ засідання кафедри
від “____” _____ 2022 р.

**СТВОРЕННЯ РОБОЧИХ ДІАГНОСТИЧНИХ МЕТОДИК ДЛЯ
ГЕНОТИПУВАННЯ ЗА ПОЛІМОРФІЗМАМИ ГЕНІВ
ACE1 I/D (RS4646994) ТА ZNF469 SNP (RS9938149) АСОЦІЙОВАНИХ З
МУЛЬТИФАКТОРНИМИ ЗАХВОРЮВАННЯМИ ЛЮДИНИ**

Випускна кваліфікаційна робота
бакалавра студента спеціальності
091 Біологія
ОП «Біологія (високі технології)»
Дзьобака Андрія Володимировича
Науковий керівник від кафедри
к.б.н., доцент **Нипорко Олексій Юрійович**

Робота виконана на базі Інституту молекулярної біології та генетики
НАН України в лабораторії геноміки, під керівництвом зав. лаб., д. б. н.,
проф. **Лівшиць Людмили Аврамівни**

Оцінка захисту роботи

Київ – 2022 р.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

SNP – однонуклеотидні поліморфізми (Single Nucleotide Polymorphism)

ACE, АKE – ангіотензин-конвертуючий ензим (Angiotensin-Converting Enzyme)

GWAS – повногеномне дослідження асоціацій (Genome Association Variation Study)

I/Д, I/D – інсерція/делеція (insertion/deletion)

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

П.н – пар нуклеотидів

Tris – трис-(гідроксиметил)-амінометан $C_4H_{11}O_3N$

РЕФЕРАТ

Дипломна робота бакалавра: сторінок - 53 , рисунків - 17, таблиць - 2
джерел - 70

У даній роботі з використанням методів молекулярної технології та біоінформатики було розроблено робочо діагностичні методики з генотипування поліморфізмів типу I/D на прикладі rs4646994 гена *ACE1* та SNP на прикладі rs9938149 гена *ZNF469*. Для цього було отримано колекцію зразків ДНК з використанням фенол-хлороформного методу екстракції. З проведенням ПЛР з детекцією в кінцевій точці методом гель-електрофорезного розділення з детекцією в УФ було відібрано референсні зразки, що виступали в якості позитивного контролю при подальшій оптимізації. Було оптимізовано температурно-часові режими, а також склад реакційних сумішей, з метою покращення ефективності перебігу реакції.

Було проведено аналіз кривих плавління продуктів ПЛР в реальному часі з використанням методу високороздільного плавлення з наступним визначенням характеристичних форм кривих плавління для кожного з генотипів, а також відповідних температур плавління.

Результатом оптимізації та розробки методик було генотипування 20 зразків, з валідацією методом гель-електрофоретичного розділення з детекцією в УФ.

Було отримано наступні розподіли генотипів:

для гена *ACE1* за поліморфізмом rs4646994 типу I/D: 8 гетерозигот, 5 осіб з генотипом ДД, та 7 осіб з генотипом ІІ.

для гену *ZNF469* за поліморфізмом rs9938149 типу SNP: 9 гетерозигот, 3 особи з генотипом СС, та 8 осіб з генотипом АА.

Відповідно до результатів дослідження методика показала свою ефективність та може бути застосована для наукових або клінічно-діагностичних потреб при генотипуванні поліморфізмів.

Ключові слова: ПОЛІМОРФІЗМ, ІНСЕРЦІЯ, ДЕЛЕЦІЯ, НУКЛЕОТИДНА ТОЧКОВА ЗАМІНА, *ACE1*, *ZNF469*, КРИВІ ПЛАВЛІННЯ, ПЛР В РЕАЛЬНОМУ ЧАСІ

Зміст

Вступ	3
1.1 ПОЛІМОРФІЗМИ ДНК.....	8
1.2 ТИПИ ПОЛІМОРФІЗМІВ.....	9
1.3 ВИКОРИСТАННЯ ПОЛІМОРФІЗМІВ ЯК ГЕНЕТИЧНИХ МАРКЕРІВ.....	10
1.4 МЕТОДОЛОГІЯ ВІДБОРУ ПОЛІМОРФІЗМІВ.....	12
1.4.1 Метод повногеномного дослідження асоціацій.....	12
1.4.2 Метод генів-кандидатів.....	14
1.5 ACE ПОЛІМОРФІЗМИ.....	16
1.5.1 Фізіологічна роль ACE.....	16
1.5.2 I/D поліморфізм гену ACE.....	18
1.5.3 I/D поліморфізм ACE та SARS-CoV-2.....	20
2.1 МАТЕРІАЛ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	26
2.2 РЕАКТИВИ.....	26
2.3 ВИДІЛЕННЯ ДНК.....	27
2.4 ПОЛІМЕРАЗНА ЛАНЦЮГОВА РЕАКЦІЯ ТА АНАЛІЗ КРИВИХ ПЛАВЛІННЯ.....	28
2.5 АНАЛІЗ ПРОДУКТІВ АМПЛІФІКАЦІЇ МЕТОДОМ ГЕЛЬ-ЕЛЕКТРОФЕРЕЗУ.....	28
3.1 СТВОРЕННЯ КОЛЕКЦІЇ ЗРАЗКІВ ДНК ДЛЯ ПОДАЛЬШОГО ГЕНОТИПУВАННЯ.....	29
3.2 РЕЗУЛЬТАТИ РОЗРОБКИ ДІАГНОСТИЧНОЇ МЕТОДИКИ ДЛЯ ГЕНОТИПУВАННЯ ПОЛІМОРФІЗМІВ ТИПУ I/D НА ПРИКЛАДІ ГЕНУ ACE1.....	30
3.2.1 Отримання референсних зразків для проведення ПЛР.....	30
3.2.2 Полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі.....	31
3.2.3 Аналіз кривих плавління продуктів ПЛР.....	33
3.2.4 Апробація та валідація результатів.....	34
3.3 РЕЗУЛЬТАТИ РОЗРОБКИ ДІАГНОСТИЧНОЇ МЕТОДИКИ ДЛЯ ГЕНОТИПУВАННЯ ПОЛІМОРФІЗМІВ ТИПУ SNP НА ПРИКЛАДІ ГЕНУ ZNF469.....	36
3.3.1 Отримання референсних зразків для проведення ПЛР з метою генотипування алелей ZNF 469.....	36
3.3.2 Оптимізація процесу ПЛР в реальному часі для гена ZNF 469.....	37
3.3.3 Аналіз кривих плавління продуктів ПЛР для SNP гену ZNF469 та валідація отриманих результатів.....	38
3.3.4 Валідація результатів отриманих з використанням методу аналізу кривих плавління шляхом використання методу секвенування за Сенгером.....	40
РОЗДІЛ 4. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	41
ВИСНОВКИ.....	46
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	47

ВСТУП

Поліморфізми ДНК – відмінності в структурі нуклеотидних послідовностей геному, що зустрічаються в популяції з частотою більше 1% та є об'єктом вивчення сучасної генетики, з огляду на їх значущість в регуляції генетичних процесів, зокрема транскрипції. Їх глибоке вивчення відкриває перспективи для розвитку персоналізованої медицини, глибокого розуміння мультифакторних хвороб.

З огляду на розвиток біоінформатичних методів, поширення алгоритмів пошуку (GWAS, метод гена-кандидата), поліморфізми дедалі детальніше розглядаються як прогностичні маркери, що можуть бути асоційованими з мультифакторними хворобами, іноді впливаючи на їх безпосередній перебіг. Генотипування геному в цьому випадку має наукову і медичну цінність, оскільки допомагає не лише визначити можливий розвиток тієї чи іншої хвороби, а також допомогти з розробкою високоефективних фармакологічних препаратів. Відповідно, метод генотипування має легко застосовуватися, масштабуватися, бути високоточним, а також бажано економічно вигідним.

Два типи поліморфізмів – інсерція/делеція та нуклеотидна точкова заміна відповідальні за всю мінливість геному, отже важливою характеристикою оптимальної методики є змога до генотипування обох цих типів поліморфізмів. Використання модифікації методу кривих плавління – високороздільного плавління є перспективним способом генотипування, а сама методика відповідає поставленим вимогам.

Генотипування I/D поліморфізму гена *ACE1* (rs4646994) є важливим з огляду на виявлений зв'язок поліморфізму з розвитком та прогресуванням SARS. Генотипування SNP гена *ZNF469* (rs9938149) доцільне з огляду на дослідження, що вказують на зв'язок цього поліморфізму з захворюванням кератоконус.

Розуміння генотипу пацієнта робить доступним прогноз розвитку захворювання, а також уможлиблює індивідуальний підбір лікарських засобів, підвищуючи шанси на одужання хворого.

Відповідно **метою роботи** є розробка модифікації методів аналізу поліморфізмів типу I/D (**rs4646994**) гена *ACE1* та типу SNP (**rs9938149**) гена *ZNF469* з використанням монохромної ПЛР в режимі реального часу.

Для виконання цієї мети були поставлені наступні завдання:

1. Отримати колекцію зразків ДНК з лейкоцитів периферійної крові індивідів з групи здорових індивідів з різних регіонів України.
2. Розробити дизайн олігонуклеотидних праймерів для проведення монохромної ПЛР в режимі реального часу.
3. Отримати референсні зразки ДНК з різними генотипами з використанням методу ПЛР, з детекцією в кінцевій точці та подальшою візуалізацією продуктів ПЛР, шляхом електрофоретичного фракціонування в 1% агарозному гелі з інтеркалюючим барвником бромистим етидієм та візуалізацією на УФ-трансліюмінаторі.
4. Оптимізувати реакційну суміш для проведення монохромної ПЛР в режимі реального часу для rs4646994 та rs9938149.
5. Відпрацювати температурно-часові режими, для проведення монохромної ПЛР в режимі реального часу для rs4646994 та rs9938149.
6. Проаналізувати патерн кривих плавління після проведення ПЛР на ДНК матриці референсних зразків з різними генотипами для rs4646994 та rs9938149.
7. Провести генотипування на вибірці з 20 зразків ДНК, визначити генотипи за характером кривих плавління та незалежно валідувати з використанням стандартного методу заснованого на проведенні ПЛР в кінцевій точці та подальшою візуалізацією продуктів ПЛР, шляхом електрофоретичного фракціонування в 1% агарозному гелі з інтеркалюючим барвником бромистим етидієм та візуалізацією на УФ-

трансліюмінаторі для rs4646994 та за результатами сиквенування продуктів ПЛР за методом Сенгера.

РОЗДІЛ 1. Огляд літератури

1.1 Поліморфізми ДНК

Існуючі відмінності в послідовностях ДНК людини, як, власне і будь якої іншої істоти називаються варіаціями. Більшість з них майже немає суттєвої функціональної значущості, в такому випадку їх називають поліморфізмами. Важливо зауважити, що поліморфізмом в даному випадку, згідно з визначенням F. S. Collins¹, вважають варіації, частота яких в досліджуваній популяції більш ніж 1%, а інші варіації вважаються рідкісними. До поліморфізмів відносять не лише одинарні заміни нуклеотидів (так звані *single nucleotide polymorphisms* (SNP)) а й інсерції та делеції послідовностей ДНК.

І хоча більшість поліморфізмів і не має глибокого функціоналу в контексті транскрипції та трансляції, оскільки лише відносно мала кількість геномної ДНК містить протеїн-кодуючі послідовності (1-2%), але часто поліморфізми можуть мати певний вплив на ген та кодований ним білок. Так, Pastinen et al. в роботі по вивченню впливу поліморфізмів в людському геномі на експресію генів виокремлює дві групи поліморфізмів – цис-варіативні та транс-варіативні. Перші лежать безпосередньо за рамками зчитування гена та впливають на його транскрипцію, синтез або структуру, а сам характер впливу є алель-специфічним. Така природа взаємодії пояснюється тим, що цис-варіативні поліморфізми знаходяться в безпосередній близькості до рамок зчитування відповідного гена, коли транс-варіативні поліморфізми ж можуть знаходитися навіть на іншій хромосомі і їх вплив поширюється на декілька алелей гена.²

Зміна в сплайсингу, дії промоторів та ехансерів, амінокислотному складі білка – вивчення функціональних особливостей поліморфізмів набуває більшої актуальності з плином часу, оскільки все частіше їх пов'язують з генетично обумовленими патологіями.

1.2 Типи поліморфізмів

Найпоширенішим типом поліморфізмів є SNP, яких, за оцінкою, Wright et al.³ може бути 3-10 мільйонів, коли мова йде про генотип людини. Даний вид мутацій виникає внаслідок транзиції - заміни азотистих основ між собою (пуринові або піримідинові), або трансверсії - заміни пуринової основи на піримідинову, або навпаки. Більшість з таких мутацій лежить за межами білок-кодуючих послідовностей, а тому вважається, що не вони не впливають на процес реалізації спадкової інформації. Це було описано в дослідженні Halushka et al.⁴, де було встановлено, що приблизно 50% SNP знаходяться в некодуючих регіонах, 25% становлять мутації, що не призводять до зміни в амінокислотній послідовності, а решта – приблизно чверть припадає на мутації, що змінюють амінокислотний склад білку, так звані міссенс мутації. Ввів проте з певними винятками, як, наприклад, поліморфізм в гені алілопротеїну E (APOE), поліморфізми якого пов'язані з патологічними станами. Ці патології виникають завдяки SNP, що спричиняє заміну амінокислот. Такі типи поліморфізмів, що викликають патологічні стани часто використовуються як генетичні маркери в молекулярній біології та медицині, зокрема при дослідженні мультифакторних хвороб.

Інсерції та делеції (іноді можна також зустріти збірну назву індел) є також поширеним видом поліморфізмів, за якого послідовність від декількох до сотень нуклеотидів є або видаленою або присутньою в структурі молекули ДНК. Хоча вони є суттєво менш поширенішими ніж SNP, але за інформацією The 1000 Genomes Project Consortium, 2010⁵ вони складають майже п'яту частину всіх поліморфізмів. Важливим при цьому є те, що індели, кількість нуклеотидів в яких не є кратною трьом призводять до зсуву рамки зчитування, що в свою чергу може призвести до появи суттєво іншої послідовності амінокислот, або виникнення передчасного стоп кодону. Такі зміни можуть зумовити появу зовсім нового структурно білка, з потенційно іншою просторовою конфігурацією, а відповідно і функціями.

Індели, в яких кількість нуклеотидів ж кратна трьом призводять до появи протеїнів з додатковими амінокислотами (інсерція), або таких де амінокислоти відсутні (делеція). Відповідно хоча більшість амінокислот залишається інтактною, місце інделу має критичне значення для функціонування протеїну, оскільки саме це визначає конфігурацію, а отже і функціональність білка, оскільки не завжди зміна в структурі білку призводить до втрати його функціоналу.⁶

Одним з найдосліджуваніших поліморфізмів даного типу є індел в гені ангіотензин-конвертуючого ензиму (АСЕ), що є ціллю для досліджень науковців, з огляду на те що даний поліморфізм демонструє зв'язок з низкою важливих клінічних показників⁷.

1.3 Використання поліморфізмів як генетичних маркерів.

Розвиток молекулярної біотехнології призвів до появи необхідності в використанні певних генетичних маркерів з метою спрощення процесу орієнтування в людському геномі, для чого, окрім певних генів часто використовують також SNP, мікро- та мінісателіти. Ще до розшифрування геному людини Shastry et al.⁸ пропонував користуватися тим фактом що дві близькі за місцезросташенням алелі (в даному випадку ген та SNP) можуть успадковуватися спільно. Таким чином поліморфізми можуть використовуватися як маркери, що допомагають ідентифікувати гени, які спричиняють патологічні стани. Відповідно продовжуючи цю ідею,⁹ запропонували порівнювати патерни генетичних варіацій в пацієнтів та здорових індивідів, таким чином потенційно ідентифікуючи гени, що відповідають за схильність до патологій. Але цим використання поліморфізмів в якості генетичних маркерів не обмежується, оскільки вони знайшли велику кількість застосувань і в тваринній біотехнології¹⁰, фармацевтиці, медицині.

SNP пропонували розглядати в контексті створення індивідуалізованих ліків. Основою для цього слугує той факт, що генетичні поліморфізми, що знаходяться в межах генів, кодуєчих протеїни, що метаболізують, транспортують препарати або є їх рецепторами, принаймні частково є відповідальними за різний вплив препарату на пацієнтів ^{8,11}. Причина цього полягає у відмінних значеннях абсорбції, поширення, метаболізму та екскреції препарату. Таким чином одна і та ж доза для людей з різними поліморфізмами може бути як високоефективною так і високотоксичною ¹². Таким чином використання поліморфізмів як одного з факторів індивідуалізації лікування є одним з актуальних напрямків розвитку фармакогенетики та фармакогеноміки.

В нашому випадку найбільш доцільним є вивчення застосування поліморфізмів саме в медичній галузі. Зміни в структурі ДНК апріорно з певною вірогідністю можуть призвести до патологічних станів, але достатньо часто для мультифакторних хвороб, тобто таких в яких поєднані екзо- та ендогенні чинники має сенс застосування відповідно мультифакторного їх аналізу. Це дозволяє викоремити чинники, що мають достатній вплив на розвиток захворювання. Саме одним з таких факторів і можуть бути різноманітні поліморфізми.

В статті Rossum et al. ¹³ описано класичний метод оцінки впливу поліморфізму на патологію. Першим кроком в ній є дослідження спрямоване на пошук асоційованих з захворюванням поліморфізмів, які в хворих на патологію проявляються достовірно частіше ніж в здоровій контрольній групі, а деякі інші статистичні дані порівнюючи носіїв конкретного поліморфізму та людей в котрих він відсутній. Найчастішими кандидатами в такому випадку виступають SNP та мікросателіти, але в теорії відібраним може бути будь-який тип поліморфізму. Наступним йде гено- та фенотипування, спрямоване на розширення вибірки досліджуваних з метою

точнішого встановлення асоціацій та теоретичне опрацювання отриманих даних.

1.4 Методологія відбору поліморфізмів.

1.4.1 Метод повногеномного дослідження асоціацій

Одним з методів, що використовується для відбору потенційно корелюючих з патологією поліморфізмів є використання повногеномного дослідження асоціацій (GWAS). Його основною задачею є виявлення зв'язків між частотою алелей та певною ознакою, або станом цієї ознаки.

Першим кроком в GWAS є ідентифікація тих ознак, відносно яких буде спостерігатися кореляція з алелями, а також відбір осіб на яких буде проводитися дослідження. Важливим в такому випадку є визначення моделі дослідження. Найчастіше такою моделлю є дві групи – з патологією і контрольна група без даної патології. Оскільки в такому випадку відбір проходить за фенотиповими ознаками, і, часто, за клінічними проявами патологій, то він отримав назву phenotype-first. Прикладом такого підходу до проведення GWAS є проведений в 2005 для пошуку кореляцій з вік-звуженою макулодистрофією. Альтернативною ж моделлю є використання змішаної групи з різною вираженістю ознаки. Прикладом такого підходу є GWAS спрямований на пошук залежностей з рівнем систолічного та діастолічного тиску.¹⁴

Наступним кроком в проведенні GWAS є власне аналіз генотипу. Часто для цього використовуються ДНК-мікрочипи спрямовані на аналіз SNP. Зокрема з недавнього часу активно використовуються мікрочипи високої щільності, що дозволило збільшити кількість поліморфізмів за якими може бути проаналізована та чи інша ознака.¹⁵ Іншим ж варіантом є використання повногеномного секвенування, яке на сьогоднішній день для дослідження такого масштабу є практично недоступним з огляду на його ціну, але дозволяє спостерігати окрім SNP також інші види поліморфізмів, а отже є

більш інформативним, і відповідно може вказати на більшу кількість ознак асоційованих з об'єктом дослідження. Наступним кроком є проведення статистичної оцінки отриманих даних. На даному етапі важливою є імпутація, що дозволяє оцінювати зв'язок між алеллю та ознакою використовуючи не наявні в мікрочипі SNP, що суттєво збільшує силу дослідження. Класичний статистичний тест для визначення значущості зв'язку – відношення вірогідностей (OR) в поєднанні з P-значеннями, після чого створюється так званий манхеттенський графік (рис.1.4.1), де найбільш значущі генетичні варіанти знаходяться зверху.

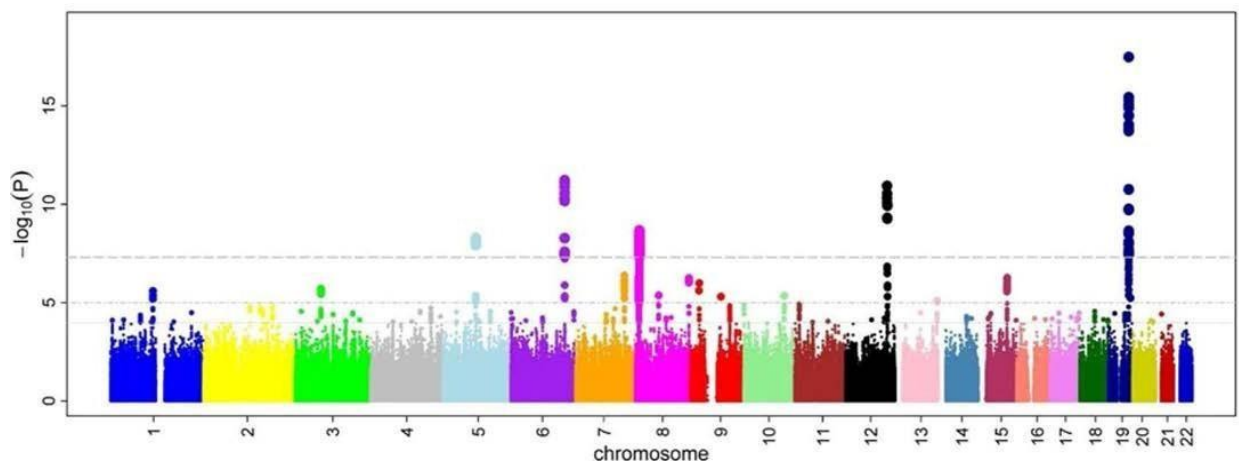


Рис. 1.1 Графічне зображення результатів OR тесту, що проводиться для методу GWAS. Адаптовано з [15]

Наступним кроком відповідно встановлюється відповідність між алеллю та досліджуваною ознакою. На цьому етапі часто необхідно встановити функціональний механізм взаємозв'язку, особливо це важливо для тих алелей, які знаходяться в некодуючих ділянках геному. На цьому етапі також використовується комп'ютерне моделювання з метою передбачення регуляторного ефекту поліморфізму на прояв ознаки. Останнім етапом є валідація отриманих результатів на клітинних культурах, модельних організмах.¹⁶

У даного способу виявлення зв'язку між генетичними варіаціями та певними ознаками є низка переваг. Так можна стверджувати що саме завдяки

GWAS вже було відмічено 52,415 варіантів SNV, що були пов'язані з тією чи іншою ознакою, що дозволяє нам стверджувати що даний метод сприяє відкриттю кореляцій з рідкісними генетичними варіаціями¹⁷.

Аналогічно важливо відмітити те що проведення великої кількості GWAS поглибило наше розуміння біологічних механізмів, зокрема патологічних,¹⁸ а також зробило можливим застосування персоналізованого підходу до здоров'я кожного пацієнта окремо, що було описано в пункті 1.3. Ще одна сильна сторона даного методу – відносна простота аналізу, поєднана з можливістю аналізу різних видів поліморфізмів, зокрема рідкісних, або таких що мають низьку частоту в популяції що є об'єктом дослідження¹⁹.

Разом з цим в даного методу є свої обмеження. Головним з них є висока коштотратність, зокрема якщо таке дослідження проводиться з використанням повногеномного секвенування. Використання ж мікрочипів суттєво обмежує можливості GWAS, зокрема в ідентифікації всіх пов'язаних з ознакою алелей, а сам мікрочип для дослідження розроблюється на вже створених завчасно рефренсних панелях,¹⁹ більшість з яких розроблена на європейських популяціях, отже для досліджень в інших популяціях є нерезепрезентативною. Досить багато дослідників звертає увагу саме на можливість некоректного трактування даних, наприклад виявлення ознак які характерні суто для певної популяції²⁰, або для патологічних станів організму в цілому, а то і взагалі неможливість виявлення всіх генетичних чинників того чи іншого патологічного стану²¹.

Підсумовуючи можна заявити, що GWAS є передовим і потенційно найважливішим інструментом для аналізу геному, важливість якого буде зростати пропорційно зменшенню вартості повногеномного секвенування, що вирішує більшість недоліків методу такого, яким ми його використовуємо в сьогодні.

1.4.2 Метод генів-кандидатів

Аналогічно до GWAS він полягає в з'ясуванні зв'язку алелей та біомедичних, еволюційних, метаболічних або навіть біхевіористичних ознак.²² В основі даного методу лежить вже з'ясована інформація про фізіологічні, біохімічні або функціональні аспекти можливого кандидата.

Завдання дослідження полягає в з'ясуванні зв'язку між обраними генами кандидатами та фенотиповими ознаками. Відповідно в цьому полягає одна з головних відмінностей з GWAS, де вибір генів відбувається на основі лабораторного та статистичного аналізу.

Варіації даного методу в основному полягають в різних підходах до вирішення питання відбору генів кандидатів.

Однією із стратегій вирішення такого питання є відбір генів за їх місцем розташування в хромосомі. Грунтуючись на отриманій інформації про зв'язок певної ознаки з відповідною ділянкою геному дослідники можуть відібрати гени кандидати, що знаходяться на ній. Такий метод не є ефективним, оскільки певна ознака рідко є моногенною, а ще рідше гени які за неї відповідають знаходяться поряд. З іншого боку такий метод досить часто знаходить гени пов'язані з ознакою²³.

Порівняльна стратегія полягає в порівнянні генів людини з генами або їх аналогами в інших видів, для яких зв'язок з відповідною ознакою вже є доведеним. Дана стратегія імплементує і підхід до розташування гена і до його функціоналу і успішно застосовується для ідентифікації генів пов'язаних з захворюваннями.²⁴ Її застосування виходить за межі геноміки, але головним її обмеженням є необхідність наявності інформації про аналогічні гени в інших видів.

Функціонально-залежна стратегія використовує дослідження метаболічного, фізіологічного а також генетичного прояву певної ознаки для локалізації відповідних відповідальних за це генів²⁵. Найпростішим прикладом є так звані нокаут тварини, в яких можна спостерігати вплив на метаболізм відсутності певного гена.

Але найчастіше використовується комбінований підхід, за якого кандидати аналізуються одразу декількома або всіма описаними методами, що дозволяє збільшити вибірку генів-кандидатів, а отже достовірніше дослідити їх вплив на обрану ознаку²².

Метод генів кандидатів дозволяє швидко визначити чи асоційована певна ознака з обраним геном. В той же час в нього є декілька недоліків, зокрема досить висока вірогідність хибно-позитивного результату, що частково базується на тому, що відбір кандидатів відбувається внаслідок інкорпорацій апріорних знань про них, отже наших знань про гени і їх взаємодію може бути недостатньо щоб робити достовірні твердження. Також досить часто необхідно звертати увагу на популяцію на якій проводять дослідження, оскільки деякі дослідники звертають увагу на часту невідтворюваність отриманих в дослідженнях даних.²⁶

Незважаючи на певні недоліки даний метод продемонстрував свою ефективність, зокрема в контексті пошуку взаємозв'язків між поліморфізмами та мультифакторними захворюваннями²⁷²⁸.

1.5 ACE поліморфізми

1.5.1 Фізіологічна роль ACE

Ангіотензин-конвертуючий ензим (ACE) це цинк металопептидаза, що поширена на поверхні ендотеліальних та епітеліальних клітин. Його завдання полягає в конвертації інактивного декапептиду ангіотензину I в активний октапептид ангіотензин II, що є важливою складовою ренін-ангіотензинової системи (РАС). Ця система відповідає за регуляцію артеріального тиску в судинах а також об'єму крові в організмі людини. Синтез реніну розпочинається з біосинтезу препрореніну на матриці мРНК в юктагломерулярних клітинах, після чого, шляхом відщеплення 23 амінокислот він перетворюється в проренін, що шляхом глікозилювання в ендоплазматичному ретикулумі набуває трьохвимірну структуру та стає

кінцевою формою – реніном. Контроль за його секрецією в кров здійснюється чотирьома чинниками, що спричинюють його активну секрецію. Цими чинниками є іннервація ниркового барорецепторного механізму в афферентній артеріолі, зміна рівня NaCl в дистальному відділі нефрона, стимуляція симпатичними нервами, а також механізм прямого зворотнього негативного зв'язку, що реалізується через прямий вплив ангіотензину на юктагломерулярні клітини. Таким чином можна стверджувати що секрецію реніну активує зниження перфузійного тиску, або рівня NaCl, а також підвищення симпатичної активності. При цьому важливо зауважити що ренін також синтезується в інших тканинах, зокрема мозку, наднирниках, яєчниках, жировій тканині, серці та судинах.

Ангіотензиноген, що синтезується в печінці перетворюється внаслідок відщеплення аміноксилот в вазоіактивну форму – ангіотензин I, що за допомогою ангіотензин-конвертуючого ензиму перетворюється в вазоіактивну форму – ангіотензин II.

Саме ангіотензин є потужним вазоконстриктором, що також впливає на кору наднирників, індукуючи секрецію альдостерону, який в свою чергу збільшує реабсорбцію натрію та води з сечі,²⁹ що безпосередньо дозволяє збільшити кількість рідини в крові, а відповідно і підвищити артеріальний тиск.

Іншою важливою роллю ангіотензину II є регуляція клітинного росту та проліферації, внаслідок стимуляції цитокінів та факторів росту³⁰. Деякі дослідження³¹ також вказують на те, що ангіотензин II може індукувати патологічний стан ендотелію, шляхом зменшення біодоступності молекул оксиду азоту.

Дані отримані внаслідок цих досліджень дозволяють нам оцінити важливість ролі ангіотензину II в розвитку кардіоваскулярних

патофізіологічних станів, а також мотивують продовжувати досліджувати роль РАС в даних патологіях.

АСЕ є також важливим учасником іншої регуляторної системи – кінін-калікреїнової. АСЕ відповідає за метаболізацію брадикініну – пептиду, що розширює судини, таким чином знижуючи артеріальний тиск. АСЕ перетворює брадикінін в неактивну форму – брадикінін 1-5. Аналогічна роль АСЕ спостерігалася для нейрокінінів³², що відіграють важливу роль в передачі болю, регуляції емоцій, а також запальних та імунних процесах.

1.5.2 I/D поліморфізм гену АСЕ

Зрозумілим є той факт, що ген, що кодує настільки важливу молекулу очікувано буде цілком дослідження на предмет поліморфізмів і їх функціонального впливу. Одним найбільш досліджених кандидатів є індел поліморфізм гену АСЕ 1 rs4646994 (хромосома 17). Цей поліморфізм полягає в наявності (I) або відсутності (D) 287 пар основ в 16 інтроні.³³

Було досліджено, що носії II алелі мали вдвічі нижчий рівень активності білку АСЕ в плазмі, порівняно з носіями алелі DD.³⁴ Таким чином не випадково було встановлено асоціацію між алелями даного поліморфізму та патофізіологічними станами, пов'язаними з роботою РАС та кінін-калікреїнової систем. Відповідно значна кількість дослідників публікувала роботи що досліджували вплив даного поліморфізму на різні захворювання, а також розглядали відмінності в носіїв різних алелей в таких аспектах як симптоматика, успішність фармакологічної терапії, взаємодія з іншими генетичними факторами, прогресування хвороби, швидкість одужання та летальність³⁵.

Дослідження асоціацій поліморфізму з артеріальним тиском показали суттєву неоднозначність в результатах, так наприклад Schmidt et al.,³⁶ Jeunemaitre et al.³⁷, не знайшли статистично достовірного зв'язку між різними алелями поліморфізму та гіпо- або гіпертензією. З іншого боку Kario et al.,³⁸

вивчаючи популяцію літніх людей Японії виявили статистично достовірну залежність між носіями алелі з делецією та підвищеним ризиком гіпертензії. Ця залежність підтверджується також результатами мета-дослідження. 28 експериментів, проведеного Staessen et al.,³⁹ де особи з DD алеллю мали на 10% більший ризик підвищеного артеріального тиску, порівняно з носіями II алелі.

Проводилися також дослідження асоціації різних алелей даного поліморфізму з перебігом артеросклерозу, використовуючи для дослідження такі ознаки як середня товщина сонної артерії (СТСА), рівень коронарного кальцинозу⁴⁰, а також визначення артеросклерозу аорти при аутопсії⁴¹. Результати більшості досліджень були неоднозначні, за винятком мета-дослідження 9833 пацієнтів, що показало більшу схильність до артеросклерозу в носіїв DD алелі.⁴²

Аналогічні тенденції до більшої схильності до захворювань в носіїв D алелі простежуються в контексті вивчення пацієнтів з ішемічною хворобою серця (ІХС), а також інсультом. Дослідження когорти людей з східної Індії, хворих на ІХС продемонструвало те, що носії алелі делеції, мають суттєво більшу схильність до ІХС, при цьому діабет, гіпертензія та паління слугують додатковими факторами негативного впливу.⁴³ При дослідженні пацієнтів госпіталізованих з гострим інфарктом міокарда не знайшли ніякої кореляції між алеллю поліморфізму та ризиком розвитку даного патологічного стану.⁴⁴ Мета-аналізи також виявили позитивні асоціації між D-алеллю та вищою вірогідністю ішемічного інсульту⁴⁵. При цьому варто зауважити, що в більшості досліджень для даного гену все ж не було знайдено жодного зв'язку з цією патологією.

Наразі існує велика кількість публікацій, що вивчають взаємозв'язок, I/D поліморфізму та патофізіологічних станів. Значна частина дослідників звертає увагу на схильність носіїв делецій до захворювань, зокрема ІХС, гіпертензії, інсульту та меншої тривалості життя⁴⁶. На противагу цьому, дослідження

пацієнтів з хворобою Альцгеймера демонструють вищий шанс її розвитку в носіїв I-алелі.

Доцільно зауважити, що велика кількість досліджень демонструють неоднозначні результати, тому такі асоціації необхідно більш змістовно дослідити, використовуючи більші популяційні вибірки, а також елементи статистичного мета-аналізу.

1.5.3 I/Д поліморфізм ACE та SARS-CoV-2

Часто COVID-19 проходить безсимптомно, або з слабовираженими симптомами. Але, згідно з повідомленнями дослідників з Нью-Йорка, приблизно 14 відсотків від госпіталізованих набувають тяжкого гострого респіраторного синдрому (SARS), та страждають на тяжку гіпоксію.

Аналогічно до форми 2002 року, SARS-CoV-2 використовує ACE 2, як рецептор для потраплення в клітину.⁴⁷ Відповідно цей процес проникнення коронавірусу призводить до зниження кількості ACE 2. Оскільки ACE 2, наряду з ACE та реніном є головними регуляторами РАС, то актуальність дослідження цього механізму, а також чинників що можуть на нього впливати зараз є надзвичайно високою.

Якщо роль ACE полягає в конвертації ангіотензину I в ангіотензин II, а також метаболізації брадикініну, то ACE 2 відповідає за конвертацію ангіотензину II в ангіотензин 1-7. Взаємодія між ACE та ACE 2 є реципрокною, коли один є індукованим, інший репресується. Дана взаємодія є основою збереження фізіологічного гомеостазу в контексті РАС. Відповідно в умовах зараження вірусом SARS-CoV-2, ангіотензин II в тілі хворого не трансформується в ангіотензин 1-7, що виводить РАС з рівноваги. В свою чергу це може сприяти розвитку SARS, збільшуючи проникливість судин, викликаючи вазоконстрикцію,⁴⁸ індукуючи апоптоз ендотеліальних клітин⁴⁹ та клітин альвеолярного епітелію. Деякі дослідники вказують також на те що такий дисбаланс може призвести до фіброзу⁵⁰, а також сприяти

прозапальним процесам, шляхом вивільнення прозапальних медіаторів: інтерлейкіну-6, інтерлейкіну-8. ⁵¹(рис. 2.)

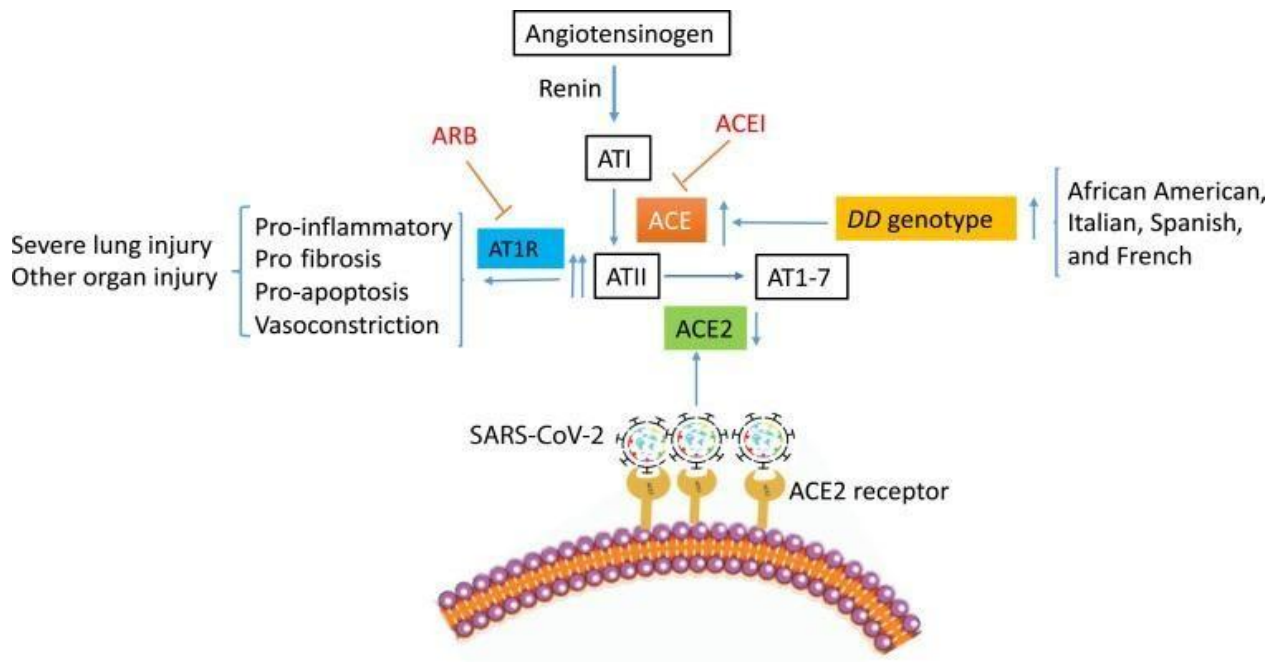


Рис. 1.2 Вплив SARS-CoV-2 на головні метаболічні шляхи за участю ACE та ACE 2.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002944020303448#bib18>

На рис. 2 ⁵¹описано механізм РАС, в контексті взаємодії з COVID-19.

Оскільки І/Д поліморфізм є одним з найголовніших чинників, асоційованих з рівнем ACE в плазмі крові, а також в тканинах організму, було висуното гіпотезу, що даний поліморфізм є дуже важливим чинником в контексті прогнозування перебігу захворювання в пацієнтів, а також розроблення персоналізованої терапії. При цьому дослідження показують, що алель з делецією пов'язана з вищим рівнем ACE ⁵².

Ця гіпотеза підтверджується дослідженням летальності від на проміжку в 28 днів, де генотип II пов'язаний з найвищим шансом виживання – 42% відсотки смертності, в той час як ІД та ДД мають 65% та 75% відповідно.

Тобто пацієнти хворі на ARDS з ІІ алелями мають суттєво вищий шанс на видужання порівняно з пацієнтами, які є носіями ДД генотипу. Така тенденція спостерігається також в інших дослідженнях ⁵³, а Adamzik et al. відмітили майже п'ятикратну різницю в смертності між особами з ІІ та ДД генотипами ⁵⁴.

Дані спостереження підтверджуються також дослідженнями минулої епідемії коронавірусу, що відбувалася в 2002 році. Тоді дослідження вказували на те, що Д алель є асоційованою з вищим ризиком гіпоксії в пацієнтів. ⁵⁵ При цьому варто звернути увагу на відносно невелику групу, на якій проводилося дослідження, а також на той факт, що аналогічні результати не були отримані при розширенні вибірки в ще одному дослідженні залежності тяжкості перебігу SARS ⁵⁶.

Незважаючи на це, більшість даних вказує на те, що І/Д поліморфізм є важливим чинником, що впливає на перебіг захворювання, схильність пацієнта до розвитку SARS, а також ураження легень.

1.6 Поліморфізми гену *ZNF469*

1.6.1 Фізіологічна роль гену *ZNF469*

Даний ген кодує один з протеїнів що містить сайт зв'язування іонів цинку і структурно подібний до білків що містять цинкові пальці. Дослідження пов'язують його функціонування як фактора транскрипції з синтезом або просторовою організацією колагену. Доведено, що порушення функцій гену *ZNF469* пов'язано з такими захворюваннями як кератоконус та синдромом Елерса – Данлоса.

1.6.2 SNP поліморфізм rs9938149 гена *ZNF496*

Велика кількість досліджень звертає увагу на можливий зв'язок SNP поліморфізма rs9938149 гена *ZNF496* з патологічним станом, що викликає кератоконус – дегенеративне захворювання рогівки, за якого відбувається її витончення і викривлення. Зокрема на сильну залежність виникнення

патологічного стану від наявності SNP поліморфізма вказує мета-аналіз Rong et al.⁵⁷ ($P = 1.3 \times 10^{-5}$) а також аналіз хворих на кератоконус австралійської популяції проведений Sahebjada et al.⁵⁸

Біоінформатичний аналіз rs99381449 вказує також на його можливе розташування в гені ENST00000437464.1, транскрипт якого відносять до lincRNA, функція якої полягає в регуляції міжклітинних процесів.

Відповідно постає потреба в розробці нових та актуалізації вже доступних методів генотипування, що відіграє важливу роль в розвитку персоналізованої медицини.

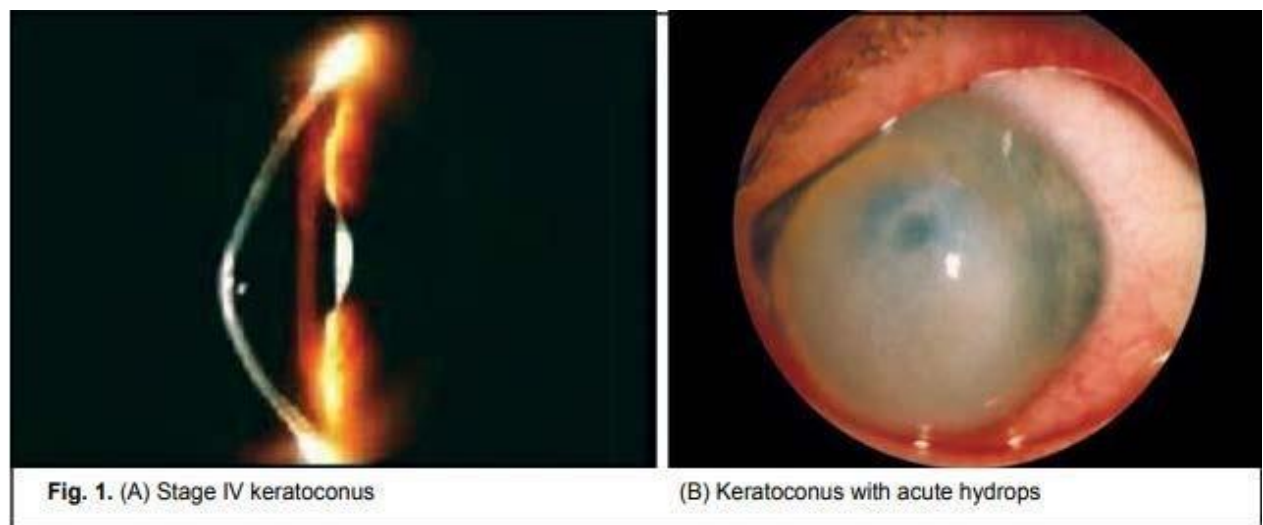


Рисунок 1.3 Зоображення патологічного стану рогівки при хворобі кератоконус Адаптовано з [70]

1.7 Метод аналізу кривих плавління

Метод полягає в вимірюванні інтенсивності флуоресценції комплексів ДНК, що дисоціюють внаслідок плавлення при нагріванні. Амплікони, що мають більший вміст гуаніну та цитозину, є висококомплементарними або мають великий розмір, дисоціюють при порівняно вищих температурах. Відповідно реакційну суміш, що містить дволанцюгові молекули ДНК нагрівають вимірюючи дисоціацію з температурою.

1.7.1 Полімеразна ланцюгова реакція

Метод є основним способом отримання *in vitro* великої кількості високоспецифічних нуклеотидних послідовностей від кількох десятків до декількох сотень пар нуклеотидів. Реакція є високоспецифічною завдяки утворенню комплементарних комплексів між ДНК-матрицею та праймерами – невеликими синтезованими олігонуклеотидними послідовностями, зазвичай 18-30 нуклеотидів в довжину. Саме структура праймерів визначає розмір продукту ампліфікації.

Принцип реакції полягає в послідовному проходженні температурних циклів, за яких в реакційній суміші, яка містить термостабільну полімеразу, відбуваються послідовно процеси денатурації, відпалу та елонгації.

Для детекції використовують електрофоретичне розділення з інтеркалюючим барвником, або модифікацію методу – ПЛР в реальному часі. Ця модифікація передбачає використання інтеркалюючих барвників для детекції зміни кількості ампліконів, продукту ПЛР, в реальному часі. Також можливим є використання мічених флуоресцентними речовинами олігонуклеотидних зондів.⁵⁹

Аналіз кривих плавління потребує напрацьованого шляхом ПЛР матеріалу і, зазвичай, використовується саме метод ПЛР в реальному часі, оскільки реєстрація зміни флуоресценції інтеркалюючого барвника є найзручнішим методом контролю дисоціації ампліконів.

1.7.2 Генотипування методом аналізу кривих плавління.

Різниця в сигнатурах кривих плавління ампліконів досягається завдяки відмінностям в розмірі та нуклеотидному складі молекул, що обумовлює відмінності в температурі дисоціації.

Розуміння структури поліморфізму дозволяє, використовуючи специфічний дизайн праймерів, отримувати амплікони які відрізняються за довжиною і гуанін-цитозиним вмістом залежно від поліморфного алеля, з якого вони були репліковані.

В контексті аналізу інсерцій або делецій праймерний дизайн є простим – достатньо помістити І/Д послідовність між фланкуючих праймерів. Для детекції SNP поліморфізмів є можливість використовувати метод за якого край праймера накладається на місце поліморфізму і за допомогою двох пар праймерів можливо розрізнити алель до якого належить зразок який генотипують.

РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи досліджень

2.1 Матеріал дослідження

Матеріалом дослідження були зразки крові здорових індивідів (донорів) з різних регіонів України.

2.2 Реактиви

Реактиви для виділення та очищення ДНК: Для виділення ДНК використовували такі реактиви: додецилсульфат натрію (ДСН або SDS), протеїназу К та набір для виділення ДНК із біологічних зразків, в тому числі крові «Проба-НК/Проба-НК-плюс» фірми DNA-Technology (Росія).

Реактиви для проведення ПЛР: Готова реакційна суміш для ПЛР “HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus” фірми Solis BioDyne (Естонія), що містить інтеркалюючий барвник EvaGreen для проведення ПЛР в реальному часі та Таq ДНК-полімеразу HOT FIREPol, 5М розчин бетаїну фірми Sigma-aldrich, доданий з метою пониження температури плавління продукту.

Синтез олігонуклеотидних послідовностей, за нашим дизайном, виконувався на замовлення компанією METABION (Німеччина). Для дизайну та перевірки послідовностей олігонуклеотидних праймерів користувалися базою даних NCBI з використанням пошукової системи BLAST SEARCH [151] та програмного забезпечення Vector NTI (Invitrogen). Отримані праймерні послідовності були розведені ddH₂O до концентрації 100 нг/мкл.

Для проведення реакції були розроблені наступні послідовності олігонуклеотидних праймерів:

<u>ACE1 Forward</u>	<u>5' CTG GAG AGC CAC TCC CAT CCT TTC T 3'</u>
---------------------	--

<u>ACE1 Reverse</u>	<u>5' GAC GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T 3'</u>
---------------------	--

Таблиця 2.1 Праймерні послідовності для гена *ACE1*

Для проведення генотипування гену *ZNF* було розроблено дві пари праймерів:

<u>A allele forward</u>	<u>5' CCTGCAATTGTCCCACAGGTCTTGCCA 3'</u>
<u>A allele reverse</u>	<u>5' CTTCTCCAAAGCCGCTGATGAAAGAGT 3'</u>
<u>C allele forward</u>	<u>5' CTTCTCCAAACAAGGACACGTTTGCAG 3'</u>
<u>C allele reverse</u>	<u>5'</u> <u>GAAAAGATGAAGAAGGACTTGATTTCTAGG 3'</u>

Таблиця 2.2 Праймерні послідовності для гена *ZNF469*

Електрофоретичне розділення: агароза (Agarose RA Biotechnology grade, фірми AMRESCO (США)), бромід етидію.

Для приготування гелю для електрофоретичного розділення ампліконів при генотипуванні *ACE1* використовували 100мл 1x TAE та 1г агарози. При генотипуванні *ZNF 469* використовували 100 мл 1x TAE та 2 г агарози.

Для нанесення проб ДНК використовувалася готова суміш 6x Gel-Loading DYE, фірми New England BioLabs (Англія).

Буфери: 50xTAE (pH-7.6) – 10М Тріс-НСl; 2,5М ЕДТА; оцтова к-та до потрібного рН.

2.3 Виділення ДНК

Виділення ДНК відбувалося фенол хлороформним шляхом з використанням протеїнази К. Даний метод був описаний Cler et al.⁶⁰

2.4 Полімеразна ланцюгова реакція та аналіз кривих плавління

В представленій роботі ампліфікацію та аналіз кривих плавління проводили на приладі iQ5™ Multicolor Real-Time PCR Detection System (BIO-RAD, США). Отримані результати оцінювалися із використанням пакету програмного забезпечення BIO-RAD iQ5 Optical System Software V 2.0 (2006). У відповідності до нуклеотидного складу послідовностей, що ампліфікуються, та довжини продукту ПЛР проводили оптимізацію робочої суміші та температурно-часового режиму.

2.5 Аналіз продуктів ампліфікації методом гель-електрофорезу.

Розділення відбувалося впродовж 35 хвилин при напрузі 260 В та силі струму 400 А.

Для нашого дослідження проводився гель-електрофорез в 1% агарозному гелі, з використанням TAE буфера на приладі Bio-Rad PowerPac Universal Power Supply. Результат спостерігали з використанням ультрафіолетового транслюмінатора Bio-Rad UV Transilluminator 2000.

Для подальшого секвенування продукт вирізували з агарози та очищували з використанням набору Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, США)

2.6 Аналіз нуклеотидних послідовностей

Секвенування проводилося з використанням апарату 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, США) та комерційного набору реактивів BigDye® Terminator Kits (Thermo Fisher Scientific, США). Для підтвердження результатів секвенування нуклеотидні послідовності було секвеновано двічі: змістовні та антизмістовні ланцюги (форвард та реверс). Після цього було проаналізовано та змінено формат файлів – результатів секвенування (з .ab1 до .fasta) за допомогою програмного забезпечення SnapGene.

РОЗДІЛ 3. Результати

3.1 Створення колекції зразків ДНК для подальшого генотипування.

Виділення днк з периферійної крові проводили шляхом гідролізу лізатів клітин протеїназою К. Після цього було проведено фенольну екстракцію. До лейкоцитів було додано 7-9 об'ємів холодного буферу сахарози і було проведено центрифугування при 3000 rcf за 4°C впродовж 15 хвилин. Осад ядер було ресуспендовано в 450-1850 мкл протеїназного буфера (при виділенні з 3-10 мл крові). Далі було доведено кінцеву концентрацію SDS в зразку до 0.5% і концентрацію протеїнази К 100 мкг/мл. Далі внаслідок інкубації лізатів ядер 2.5 годин при 55 градусах було проведено фенольну депротеїнізацію (Рн 8.0) з використанням рівних об'ємів хлороформу і фенолу. Для преципітації ДНК було додано 2.5 об'ємів етилового спирту (охолодженого). Після преципітації препарат було висушено та розведено в ТЕ. Препарат було оцінено з використанням спектральних характеристик та електрофоретичним розділенням в 1% агарозному гелі.

Спектральні характеристики та концентрацію ДНК було визначено з допомогою ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop, США) у діапазоні λ 220 – λ 300. Відношення оптичної щільності, що визначали при λ 260 та при λ 280, показує чистоту препарату ДНК по відношенню до білків і має знаходитися між 1,9 та 2,0. Значення менше 1,8 вказує на наявність у розчині значної кількості білків, а вище 2,0 – на домішки РНК. Деякі білки крім поглинання при λ 280 мають максимум при λ 230, до того ж, поглинання в цьому діапазоні хвиль відбувається також для багатьох інших органічних сполук. Таким чином, відношення λ 260 / λ 230 для нативної ДНК без органічних домішок має складати 2,0.

За підсумками було виділено 20 зразків, які було проаналізовані за їх спектральними характеристиками та концентрацією.

Середня концентрація ДНК в зразках становила 40-50 нанограм на 1 мікролітр. Відношення λ 260 / λ 270 становило 1.3, відношення λ 260 / λ 280 становило 1.8.

3.2 Результати розробки діагностичної методики для генотипування поліморфізмів типу I/D на прикладі гену ACE1

3.2.1 Отримання референсних зразків для проведення ПЛР

Для визначення референсних зразків ДНК з різними генотипами за алейним поліморфізмом I/D у 16-му інтроні гена ACE1 проводили аналіз продуктів специфічної ПЛР з детекцією в кінцевій точці.

Склад реакційної суміші, а також температурно часові режими для проведення ПЛР з детекцією в кінцевій точці були взяті відповідно до методу описаного раніше.⁶¹

Було проведено hot-start ПЛР, з початковою етапом hot-start впродовж 3 хвилин при 94 градусах, а потім 35 циклів денатурації (1хв, 94 град), відпалу (64 град 1 хв) і елонгації (72град 1 хв). Після чого проводилася фінальна екстинкція впродовж 2 хвилин при температурі 72 град.

Отримані амплікони далі розділяли методом гель-електрофорезу в агарозному гелі з використанням інтеркалюючого барвника бромистого етидія. Розділення відбувалося впродовж 35 хвилин при напрузі 260 В та силі струму 400 А. Референсом виступав маркер молекулярної маси 100-1000 2-log DNA Ladder від Thermo Fisher з кроком 100 п.н.

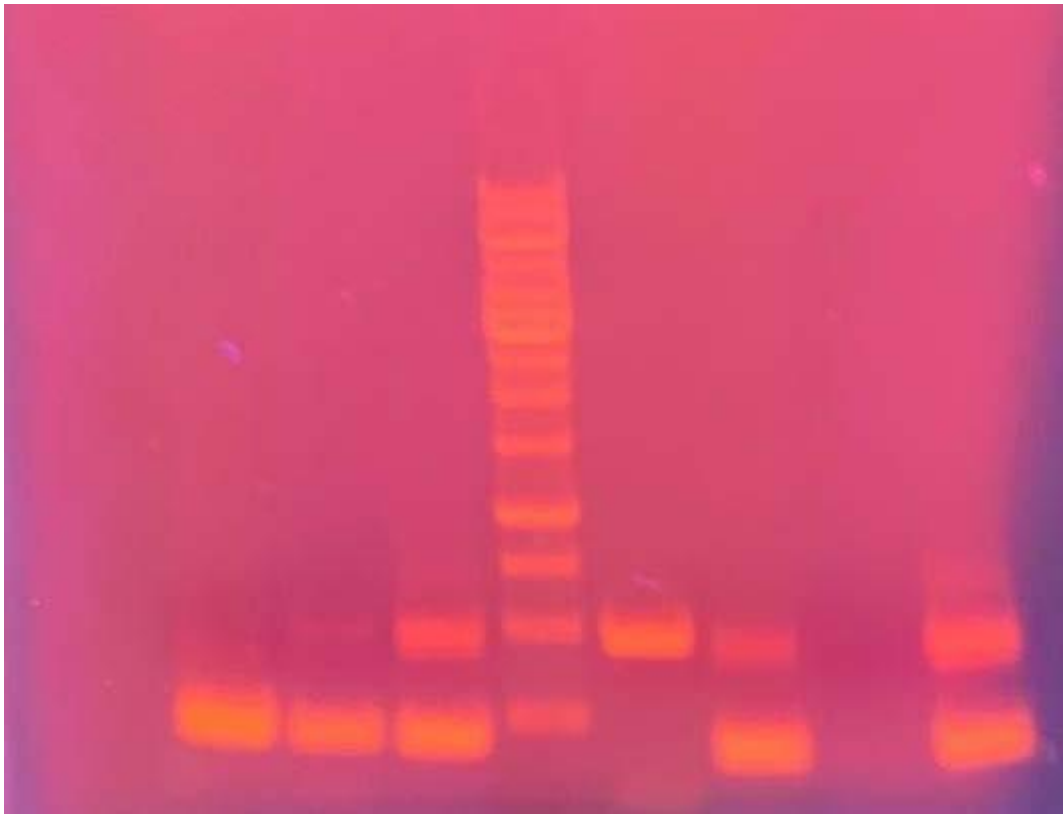


Рис. 3.1 Результати електрофоретичного розділення продуктів ПЛР, отриманих з референсних зразків для гена ACE1.

За результатом електрофорезу було відібрано зразки з усіма варіантами генотипів: ІД, ІІ, ДД. Їх в подальшому можна було використовувати як референсні для розробки методу детекції в режимі реального часу.

3.2.2 Полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі

Отримані референсні використовували як ДНК матрицю для проведення монохромного ПЛР в реальному часі. В даному випадку інтеркалюючим агентом виступав барвник Eva Green. При використанні початкового протоколу ПЛР не вдалося отримати бажану ефективність реакції (3.3.1). Тому він був модифікований з подовженням етапів hot-start і елонгації, на 8 хвилин а температуру відпалу було підвищено на 1 градус, що сприяло більшій ефективності реакції (рис3.3.2).

Тому після оптимізації було підібрано наступний температурний режим:

1. 12 хвилин денатурація при 95°C;

2. 1 хвилину денатурація при 95°C;
3. 1 хвилину відпал при 65°C;
4. 1 хвилину елонгація при 72°C;
5. Повторення циклу (2-4) 40 разів
6. 10 хвилин елонгація при 72°C;

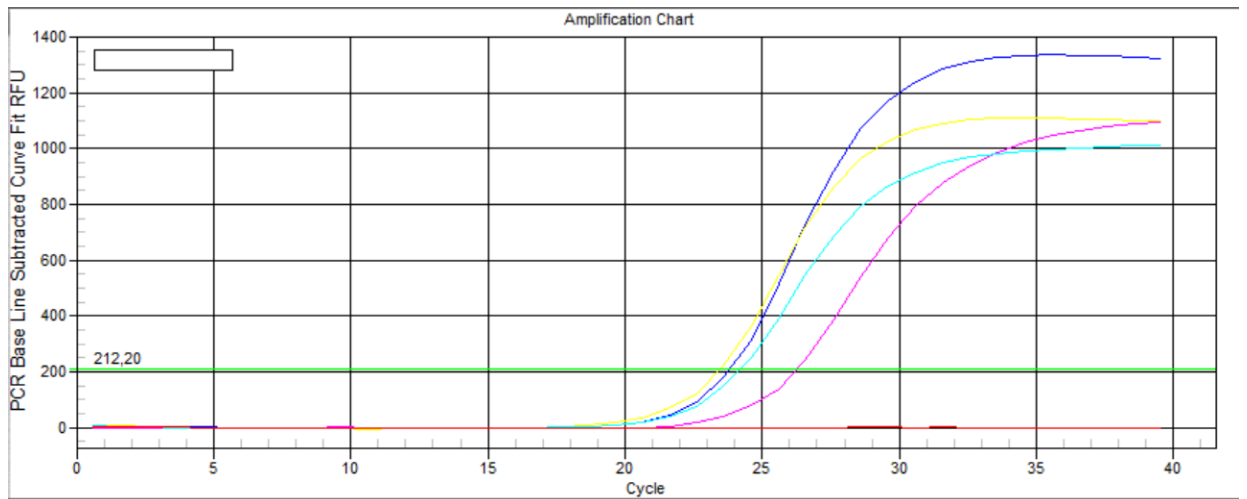


Рис. 3.2 Результати при проведенні ПЛР з використанням стандартного протоколу

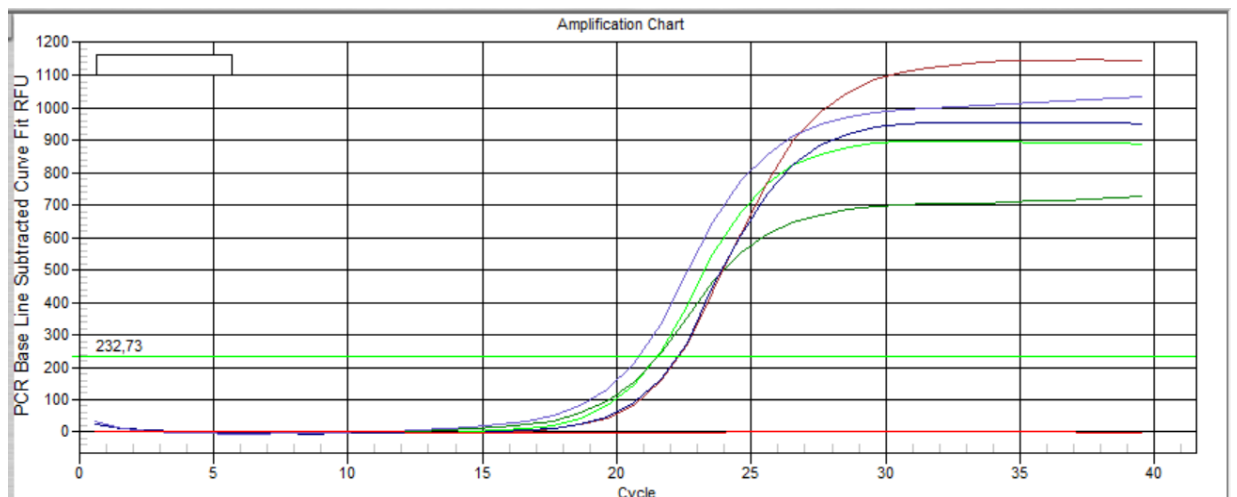


Рис 3.3 Результати при проведенні ПЛР з модифікованим протоколом

3.2.3 Аналіз кривих плавлення продуктів ПЛР

Після проведення монохромної ПЛР в реальному часі було проведено аналіз кривих плавлення, з використанням барвника Eva Green. Заміри проводилися за наступним температурним режимом: початкова температура 55°C, підвищуючи до 95°C, з кроком 0.5°C кожні 5 секунд.

За результатами аналізу в програмному забезпеченні було побудовано графік залежності інтенсивності флуоресценції від температури, а також графік похідної від інтенсивності флуоресценції до температури.

За результатами було виявлено два типи кривих, що відповідали алелям попередньо визначених референсних зразків.

Значення піки кривих плавлення, що відповідають температурам за яких денатурувало 50% відповідного амплікона були наступними: 83 і 89 °C.

Значення 83°C відповідало алелі делеції, а 89°C - інсерції відповідно.

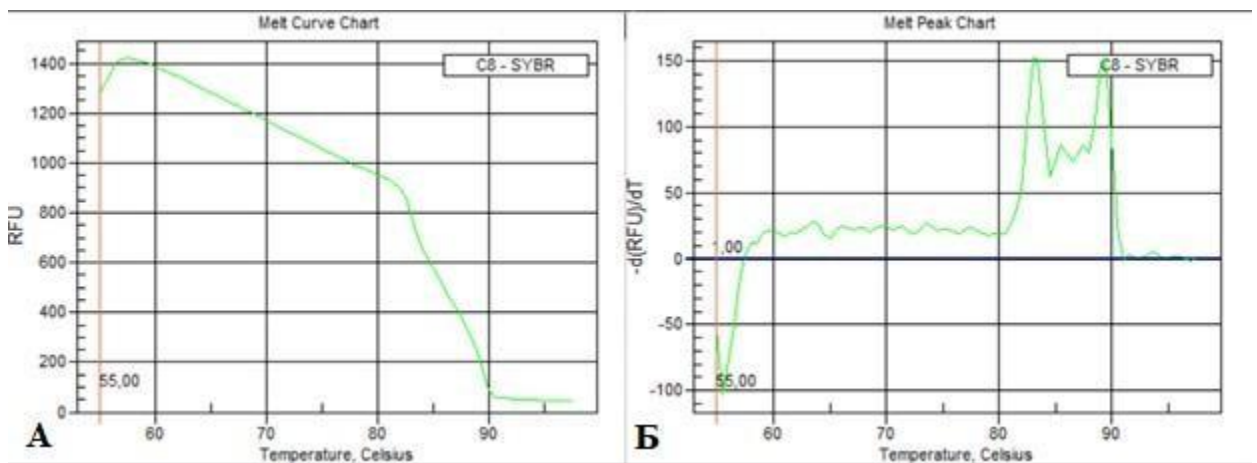


Рис 3.4 Гетерозигота ІД (а) залежність інтенсивності флуорисценції від температури, б) Залежність від'ємної похідної флуорисценції ($-d(RFU)/dT$) від температури

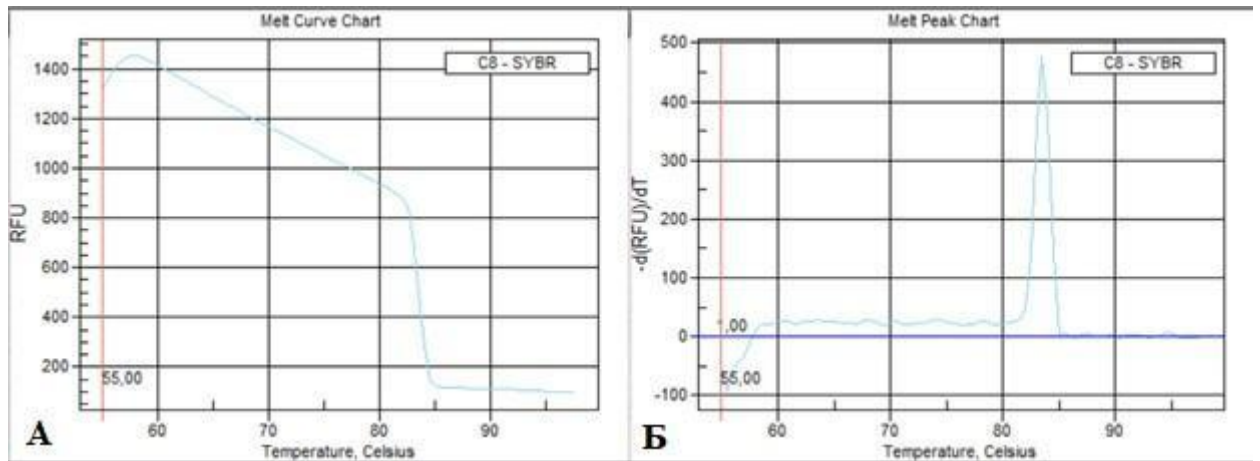


Рис 3.5 Генотип ДД (а) залежність інтенсивності флуорисценції від температури б) Залежність від'ємної похідної флуорисценції ($-d(\text{RFU})/dT$) від температури

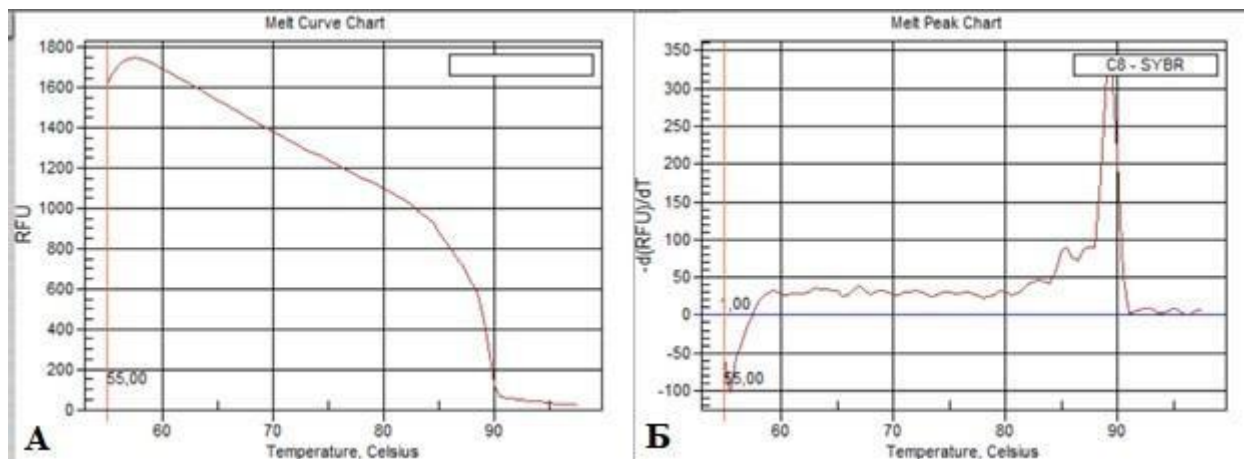
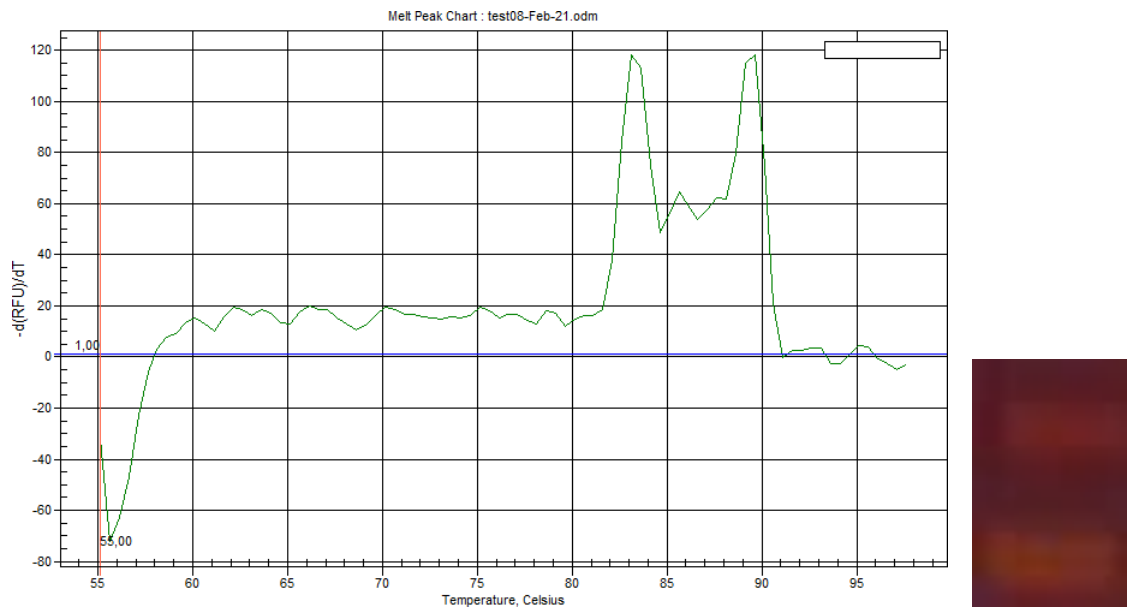


Рис 3.5 Генотип II (а) залежність інтенсивності флуорисценції від температури б) Залежність від'ємної похідної флуорисценції ($-d(\text{RFU})/dT$) від температури

3.2.4 Апробація та валідація результатів

Розроблену методику було застосовано для геноіпування на вибірці з 20-и зразків лейкоцитарної ДНК. А потім було валідовано шляхом використання незалежного методу ПЛР в кінцевій точці з подальшою візуалізацією шляхом розділення в агарозному гелі з використанням гелю електрофорезу та УФ-Візуалізацією.

Зразок такої валідації представлено на рисунку 3.6



а

б

Рис. 3.6 а) результат з використанням аналізу кривих плавління б) результат з використанням методу ПЛР в кінцевій точці з подальшою візуалізацією шляхом розділення в агарозному гелі з використанням гель електрофорезу та УФ-Візуалізацією.

За результатами дослідження було отримання такі результати генотипування: 8 гетерозигот, 5 осіб з генотипом ДД, та 7 осіб з генотипом ІІ.

3.3 Результати розробки діагностичної методики для генотипування поліморфізмів типу SNP на прикладі гену ZNF469

3.3.1 Отримання референсних зразків для проведення ПЛР з метою генотипування алелей ZNF 469

Визначення референсних зразків для генотипування SNP rs9938149 гена ZNF469 проводили з використанням ПЛР з детекцією продуктів в кінцевій точці. Склад реакційної суміші, температурно часові режими були ідентичними до описаних вище.

Було проведено hot-start ПЛР, з початковим етапом hot-start впродовж 3 хвилин при 94 градусах, а потім 35 циклів денатурації (1хв, 94 град), відпалу (64 град 1 хв) і елонгації (72град 1 хв). Після чого проводилася фінальна екстинкція впродовж 2 хвилин при температурі 72 град.

Отримані амплікони далі розділяли методом гель-електрофорезу в агарозному гелі з використанням інтеркалюючого барвника бромистого етидію. Розділення відбувалося впродовж 40 хвилин при напрузі 240 В та силі струму 400 А. В якості референсу використовували маркер молекулярної маси 100-1000 2-log DNA Ladder від Thermo Fisher з кроком 100 п.н.

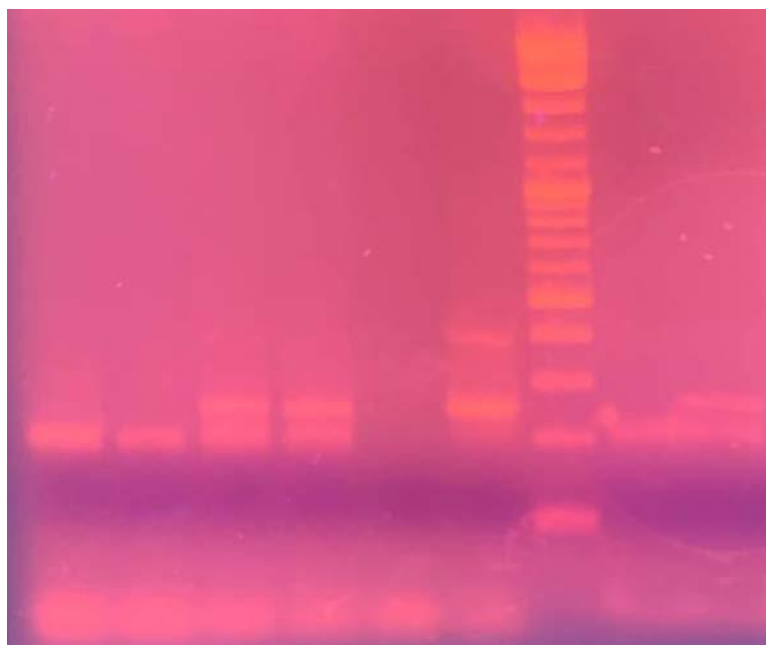


Рис 3.7 Результати електрофоретичного розділення продуктів ПЛР, отриманих з референсних зразків для гена ZNF469.

Результатом електрофоретичного розділення було отримання зразків з усіма трьома варіантами генотипів: АА, АС і СС. В подальшому їх використання буде необхідним для розробки методики генотипування з детекцією за допомогою ПЛР в реальному часі.

3.3.2 Оптимізація процесу ПЛР в реальному часі для гена ZNF 469

Референсні зразки, що ми отримали на попередньому етапі були використані як матричні для проведення монохромної ПЛР в реальному часі. Як інтеркалюючі агенти використовували барвник SYBR Green та EvaGreen. Для покращення ефективності реакції ми провели оптимізацію температурно-часового режиму. Hot-start етап було зменшено на 9 хвилин, з підняттям температури до 95 °. Також було зменшено кількість циклів, з метою усунення неспецифічного сигналу. Температуру етапу денатурації та відпалу було піднято на градус, а час етапів був зменшений на 40 та 30 секунд відповідно. Відповідно внаслідок оптимізації було отримано наступний температурно-часовий режим:

1. 5 хвилин денатурація при 95°
2. Денатурація при 95° 20 секунд
3. Відпал при 65° 30 секунд
4. Елонгація при 72° 1 хвилину
5. Повторення циклу (2-4) 30 разів
6. Фінальна елонгація при 72° 10 хвилин

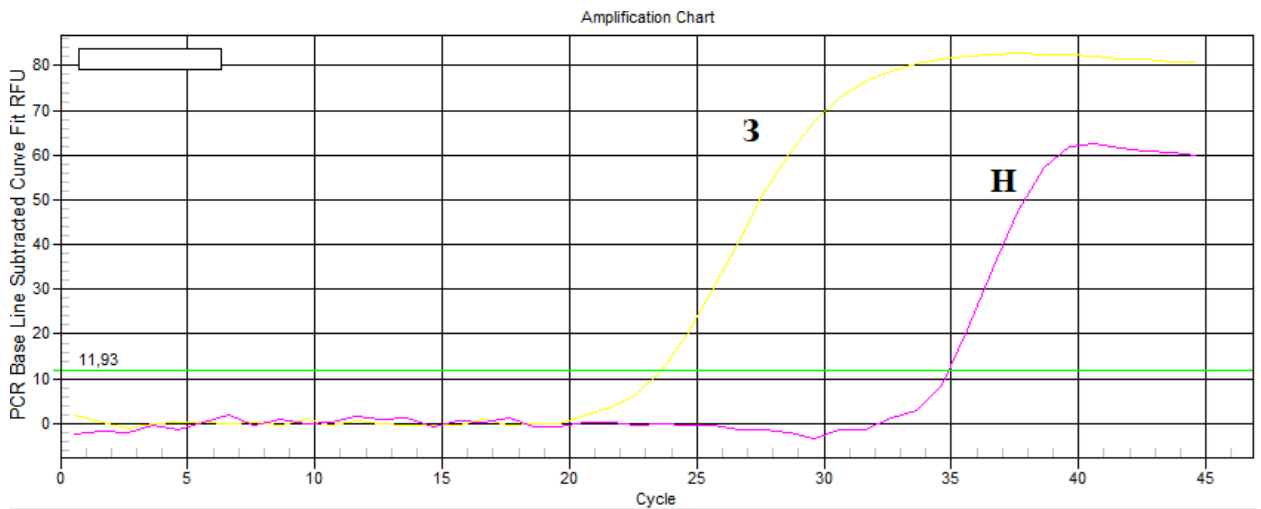


Рис. 3.7 а) Зразок (З) та негативний контроль (Н) до оптимізації температурно-часового режиму

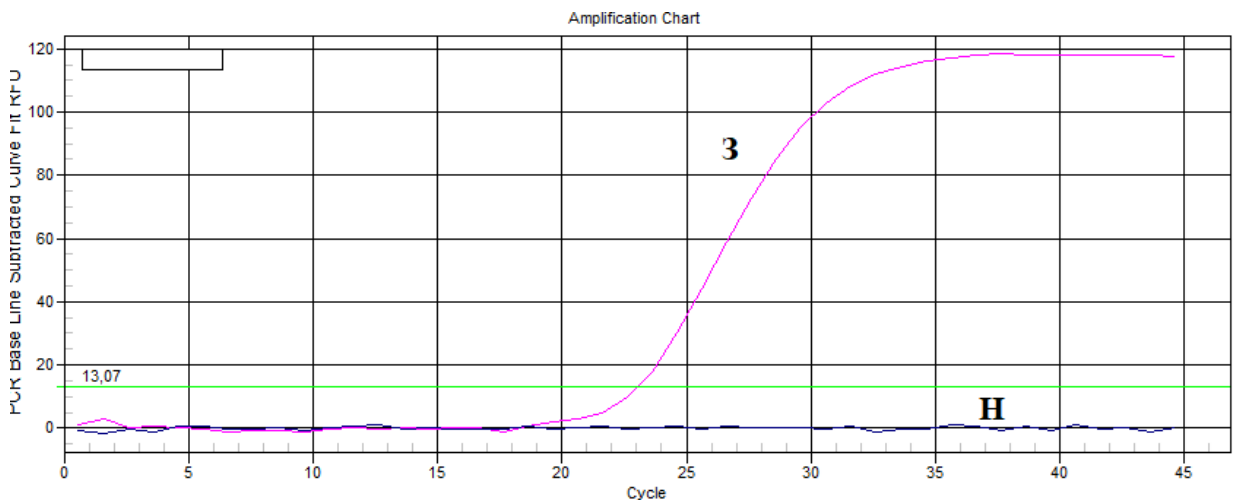


Рис. 3.8 а) Зразок (З) та негативний контроль (Н) після оптимізації температурно-часового режиму

3.3.3 Аналіз кривих плавління продуктів ПЛР для SNP гену *ZNF469* та валідація отриманих результатів.

Після оптимізації температурно-часового режиму було проведено ПЛР в реальному часі для вибірки зразків, після чого використано метод кривих плавління з детекцією в реальному часі.

Для проведення дослідів було використано наступний температурно-часовий режим:

початкова температура – 55°C з підняттям температури на 0.5°C кожні 5 секунд до фінальної температури 95°C.

З використанням програмного пакету iQ5 Opticon Monitor було побудоване графічне відображення залежності відносної інтенсивності флуоресценції досліджуваного зразку від температури, а також графік похідної залежності відносної флуоресценції до температури.

В результаті ми отримали три типи форм кривих плавління з різними значеннями температури плавління. Отримані значення відповідали алелям попередньо прогенотипованих референсних зразків.

З графіку залежності похідної відносної флуоресценції від температури ми можемо визначити температуру плавління – температуру, яка визначає стан, в якому 50% молекули ДНК денатурувало.

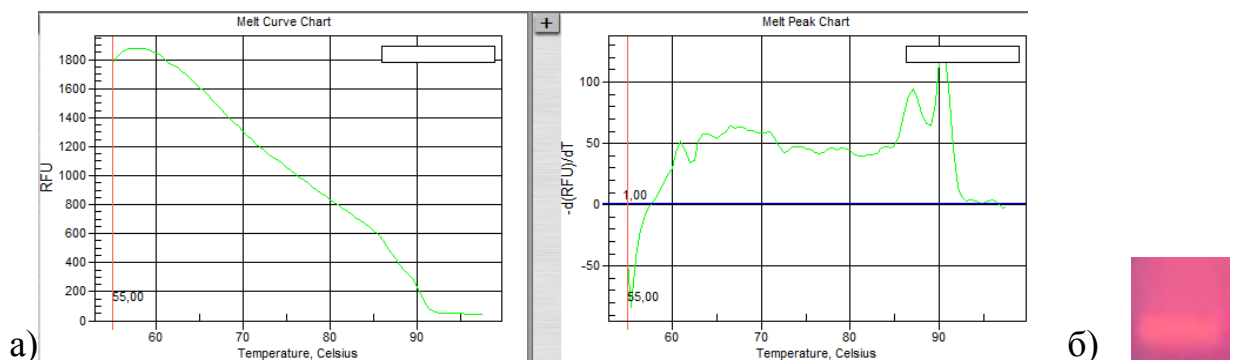


Рис 3.9 Результат валідації для гомозиготи за А алеллю з а) використанням аналізу кривих плавління б) ПЛР з детекцією в кінцевій точці, шляхом гель-електрофорезу

Для гомозиготи за А алеллю на графіці ми можемо виділити два характеристичних піки – 87.5°C та 90°C відповідно

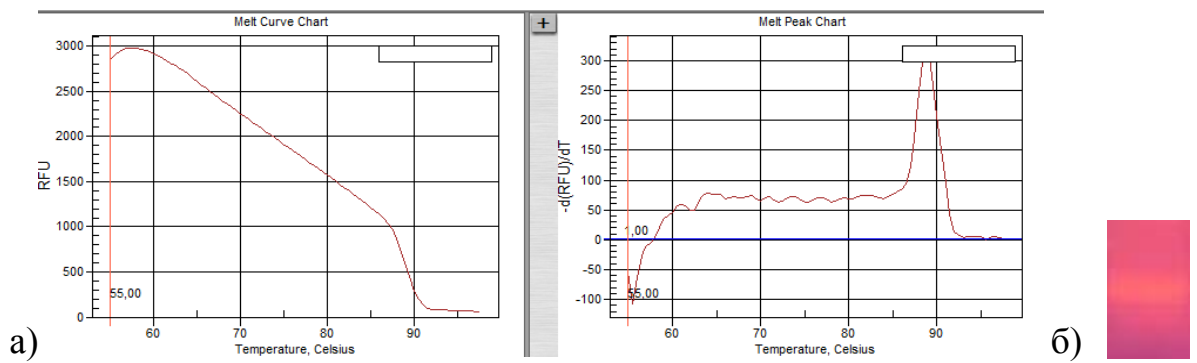


Рис. 3.10 Результат валідації для гомозиготи за С алелем а) використанням аналізу кривих плавління б) ПЛР з детекцією в кінцевій точці, шляхом гель-електрофорезу

Для гомозиготи за С алелем ми можемо виділити характеристичний пік 89°C , за формою – пік має дві прямі лінії, що сходяться.

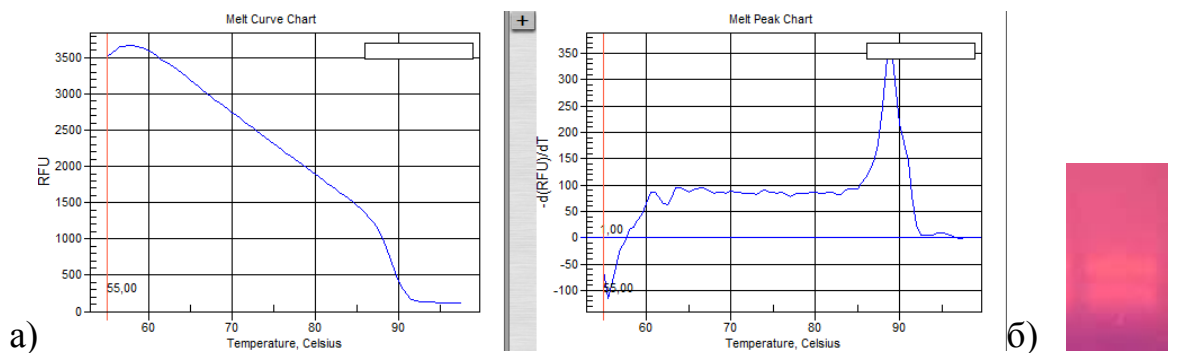


Рис. 3.11 Результат валідації для гетерозиготи з а) використанням аналізу кривих плавління б) ПЛР з детекцією в кінцевій точці, шляхом гель-електрофорезу

Для гетерозиготи температура плавління становить 89°C , але пік має характерну форму, з пологим спадом за збільшення температури.

За результатами генотипування ми отримали наступні генотипи: 8 осіб з генотипом АА, 3 особи з генотипом СС, 9 гетерозигот.

3.3.4 Валідація результатів отриманих з використанням методу аналізу кривих плавління шляхом використанням методу секвенування за Сенгером.

З урахуванням того, що однонуклеотидна заміна є найменшим проявом мінливості геному нами було обрано найчутливіший метод валідації отриманих нами внаслідок генотипування результатів – секвенування за Сенгером.

Було проведено ПЛР згідно розроблених температурно-часових норм з використанням зразку, попередньо генотипованого як гетерозигота.

Частина зразку було використано для проведення гелелектрофоретичного розділення з метою перевірки якості отриманого продукту.

Після цього зразок було надіслано на секвенування. Отримані результати було проаналізовано з використанням програмного пакету SnapGene.

Отримавши результати секвенування ми побудували хроматограму, та визначили місце SNP поліморфізму rs9938149 (рис 3.12).

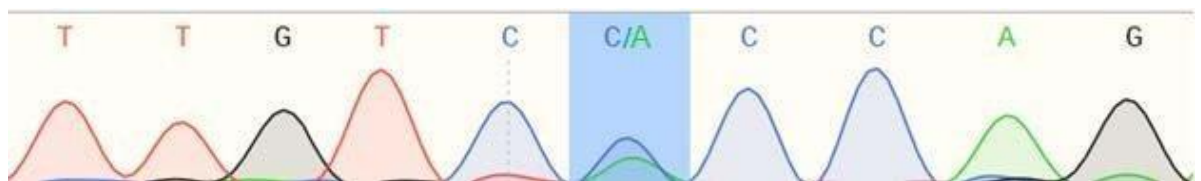


Рис. 3.12 Хроматограма секвенування за Сенгером зразка, генотипованого як гетерозигота

За отриманими результатами ми спостерігаємо сигнал від цитозинового та аденінового нуклеотидів, що відповідає очікуваному для rs9938149 (NC_000016.9:g.88331640C>A).

РОЗДІЛ 4. Обговорення результатів

Метод генотипування I/D поліморфізму rs464994 гена ACE1 з використанням ПЛР в реальному часі, а також аналізом кривих плавління продемонстрував свою ефективність та збіжність результатів. Це, поєднано з порівняно меншими затратами часу, а також відносно невисокою вартістю робить його ідеальним для генотипування великої вибірки зразків. Разом з

цим важливо відмітити, що досить велика частка останніх досліджень даного поліморфізму не пропонувала використання аналізу кривих плавління. Так, наприклад, в дослідженні зв'язку COVID-19 з алелями поліморфізму rs464994, проведеному Yamamoto et al. використовувалися дані з баз даних, що містили секвеновані геноми жителів різних країн⁶². Низка інших дослідників, зокрема Gomez et al.,⁶³ Verma et al.,⁶⁴ використовують в своїх дослідженнях метод генотипування з проведенням ПЛР з детекцією в кінцевій точці і наступним електрофоретичним розділенням. Ще одним з запропонованих методів є проведення ПЛР з детекцією результатів з використанням Nanogen-чипа⁶⁵.

При цьому зрозумілим є те, що метод проведення ПЛР в реальному часі є більш економічно вигідним⁶⁶, а, власне, генотипування може займати до чотирьох годин і застосовуватися в широкомасштабних клінічних дослідженнях, а також діагностичних аналізах з суттєво меншими затратами часу.

Вперше метод аналізу поліморфізму rs464994 шляхом проведення монохромної ПЛР в реальному часі і аналізу кривих плавління був запропонований ще в 2001 році в публікації Mei-Hui Lin et al.,⁶¹ але в цьому дослідженні було використано структурно відмінні послідовності праймерів, а також інший температурно-часовий режим, що передбачав швидше проходження ПЛР. Схожі температурно часові режими можна також спостерігати в працях Biller et al.[72] і Nissen et al., при цьому дослідники використовували суттєво менший час активації полімерази на першому кроці ПЛР, що пов'язано з особливостями обраних для проведення реакції реактивів. Але при цьому було запроваджено менший часовий проміжок покрокового вимірювання при підвищенні температури для аналізу кривих плавління, що дозволило збільшити роздільну здатність методу. Одним з останніх досліджень даного методу є дослідження Kiso et al.,⁶⁶ де було використано подібний до нашого температурно часовий режим, а піки на графіку залежності похідної від флуорисценції за температурою співпадали зі

значеннями отриманими в ході нашого дослідження. Вдосконаленням цього методу, запровадженого японськими дослідниками, стала пропозиція використовувати зразки ДНК зі слини, що показали аналогічні результати до ДНК отриманої з лейкоцитів крові. Таке вдосконалення є дуже значущим при проведенні широкомасштабних генотипувань оскільки суттєво спрощує отримання генетичного матеріалу.

Результати отримані в ході нашого дослідження демонструють збільшення ефективності ПЛР при подовженні часових рамок кожної з складових циклу, а також пропонують підвищення температурного режиму для даної пари праймерів. Такі зміни не викликають утворення неспецифічних продуктів, але сприяють зростанню ефективності реакції.

Використання методу кривих плавління для генотипування SNP поліморфізмів є доволі новим підходом в біотехнологічному сенсі.

Генотипування точкових нуклеотидних замін потребує суттєво більшої чутливості методу до змін в нуклеотидній послідовності, що забезпечувалося низкою різних підходів, зокрема використанням мас-спектроскопії, пробами лігування нуклеотидів, та динамічною алель-специфічною гібридизацією (ДАСГ), використанням спеціальних олігонуклеотидних зондів (Taq-man). Ці методи є дієвими, але всі мають суттєве обмеження через високу ціну аналізу, через необхідність виготовлення специфічних проб для генотипування кожного SNP. Використання цих методів потребує, окрім того, вартісного спеціалізованого обладнання⁶⁷

Метод кривих плавління може бути використаним для різних підходів з генотипування SNP, так, наприклад, Akey et al. поєднали використання рестрикції нуклеотидних послідовностей з подальшим аналізом плавління молекул, а дослідники з Roche розробили метод, що використовуючи спеціальний інтеркалюючий агент допомагає розрізняти гетеродуплекси, що формуються у випадку гетерозиготного генотипу Garritano et al.⁶⁸ модифікували даний метод, завдяки використанню спайк-ін послідовностей,

що додаються до геномної ДНК перед генотипуванням, та утворюють гетеродуплекси при плавленні.

Дослідники також використовують мікрочипові системи з використанням нанотехнологій, зокрема детектори, що використовують плівкові напівпрозорі нагрівачі, розташовані на поліетилен нафталаті.⁶⁹

Підхід використаний в цій роботі полягає в дизайні таких пар праймерів, що фланкують одонуклеотидну заміну, а довжина амплікону залежить від алельного варіанту, який за розміром відповідає інерції або делеції. Перевагою такого метода є простота його використання, що зберігається з масштабуванням дослідження, та може використовуватися та відтворюватися постійно, з мінімальним спеціальним устаткуванням. Недоліком даного підходу є необхідність дизайну декількох пар праймерів для кожного з аналізованих SNP, оптимізація та валідація методу на референсних зразках.

Саме покращення способів дизайну таких послідовностей таких праймерів, передбачення форми та температури кривих плавління, збільшення діапазону чутливості методу до відмінностей в нуклеотидному складі ампліконів мають бути цілями подальших досліджень.

Використання високо роздільного плавління, як модифікації методики кривих плавління набуває більшого поширення, з огляду на більшу доступність інтеркалюючих барвників нового покоління (зокрема EvaGreen), що не інгібують процес ампліфікації при збільшенні їх концентрації, а також в програмному та апаратному покращенні можливостей детекції та обробки сигналів флуоресценції зразку.

Використання методик генотипування поліморфізмів типу I/D та SNP, описаних в даній роботі, важливе не лише для генетичного аналізу популяційних вибірок, з метою встановлення кореляції між тим чи іншим поліморфізмом та патологічним станом який він викликає, але і в силу простоти використання та великої варіативності використання може знайти застосування для широкого спектру задач, зокрема і клінічної діагностики,

що дозволить покращити підходи індивідуальної медицини які використовують вже сьогодні.

ВИСНОВКИ

1. Отримано колекції зразків ДНК, що налічує 20 зразків, виділених з лейкоцитів периферійної крові індивідів досліджуваних груп.

2. За результатами генотипування поліморфізму типу I/D rs464994 гену ACE1 методом ПЛР з детекцією в кінцевій точці було отримано референсні зразки на всі варіанти генотипів: II, ID, DD. Які в подальшому використовували в якості позитивного контролю.

3. Відповідно до результатів генотипування поліморфізму типу SNP rs9938149 гену ZNF469 методом алель специфічної ПЛР з детекцією в кінцевій точці, а також за результатами сиквенування продуктів ПЛР за методом Сенгера, були отримані референсні зразки для всіх варіантів генотипів: AA, CC, AC. Які в подальшому можуть бути використані як контрольні.

4. Відпрацьовано температурно-часові режими для проведення монохромної ПЛР в реальному часі, що дозволили досягнути високої якості детекції продуктів ПЛР.

5. З метою пониження температури плавлення проведено модифікацію реакційної суміші для ПЛР, з додаванням бетаїну.

6. За результатами проведення монохромної ПЛР в реальному часі встановлено відповідність патерну кривих плавлення алельним варіантам генів ACE1 та ZNF469 у референсних зразках – **валідація методу**.

7. За результатами генотипування колекції з 20-и зразків ДНК індивідів контрольної групи було виявлено наступний розподіл генотипів (Апробація методу).

Для гену ACE1: 8 гетерозигот, 5 осіб з генотипом DD, та 7 осіб з генотипом II.

Для гену ZNF469: 9 гетерозигот, 3 особи з генотипом CC, та 8 осіб з генотипом AA.

Список використаної літератури

1. Collins FS, Brooks LD, Chakravarti A. A DNA Polymorphism Discovery Resource for Research on Human Genetic Variation: Table 1. *Genome Research*. 1998;8(12):1229-1231. doi:10.1101/gr.8.12.1229
2. Pastinen T, Ge B, Hudson TJ. Influence of human genome polymorphism on gene expression. *Hum Mol Genet*. 2006;15 Spec No 1. doi:10.1093/hmg/ddl044
3. Wright AF. Genetic Variation: Polymorphisms and Mutations. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. ; 2005. doi:10.1038/npg.els.0005005
4. Halushka MK, Fan JB, Bentley K, et al. Patterns of single-nucleotide polymorphisms in candidate genes for blood-pressure homeostasis. *Nature Genetics*. 1999;22(3). doi:10.1038/10297
5. The 1000 Genomes Project. ARTICLE A global reference for human genetic variation The 1000 Genomes Project Consortium*. *Nature Article*. 2015;526.
6. Boltz, M., Rau, H., Williams, P., Rau, H., Williams, P., Upton, J., ... Anane L. No Title. *Encyclopedia of Behavioral Medicine*. 2013;1:1076–1076. doi:doi:10.1007/978-1-4419-1005-9_706
7. Scharplatz M, Puhon MA, Steurer J, Bachmann LM. What is the impact of the ACE gene insertion/deletion (I/D) polymorphism on the clinical effectiveness and adverse events of ACE inhibitors? - Protocol of a systematic review. *BMC Medical Genetics*. 2004;5. doi:10.1186/1471-2350-5-23
8. Shastry BS. SNPs: impact on gene function and phenotype. *Methods Mol Biol*. 2009;578. doi:10.1007/978-1-60327-411-1_1
9. Hirschhorn JN, Daly MJ. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nature Reviews Genetics*. 2005;6(2). doi:10.1038/nrg1521
10. Marwal A, Sahu AK, Gaur RK. Molecular Markers. In: *Animal Biotechnology*. ; 2014. doi:10.1016/b978-0-12-416002-6.00016-x
11. Evans WE, Johnson JA. Pharmacogenomics: The inherited basis for interindividual differences in drug response. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 2001;2. doi:10.1146/annurev.genom.2.1.9

12. Krajinovic M, Elbared J, Drouin S, et al. Polymorphisms of ABCC5 and NOS3 genes influence doxorubicin cardiotoxicity in survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J.* 2017;17(1). doi:10.1038/tpj.2016.86
13. Van Rossum EFC, Russcher H, Lamberts SWJ. Genetic polymorphisms and multifactorial diseases: Facts and fallacies revealed by the glucocorticoid receptor gene. *Trends in Endocrinology and Metabolism.* 2005;16(10). doi:10.1016/j.tem.2005.10.009
14. Surendran P, Drenos F, Young R, et al. Trans-ancestry meta-analyses identify rare and common variants associated with blood pressure and hypertension. *Nature Genetics.* 2016;48(10). doi:10.1038/ng.3654
15. Pulit SL, de With SAJ, de Bakker PIW. Resetting the bar: Statistical significance in whole-genome sequencing-based association studies of global populations. *Genetic Epidemiology.* 2017;41(2). doi:10.1002/gepi.22032
16. Tam V, Patel N, Turcotte M, Bossé Y, Paré G, Meyre D. Benefits and limitations of genome-wide association studies. *Nature Reviews Genetics.* 2019;20(8). doi:10.1038/s41576-019-0127-1
17. MacArthur J, Bowler E, Cerezo M, et al. The new NHGRI-EBI Catalog of published genome-wide association studies (GWAS Catalog). *Nucleic Acids Research.* 2017;45(D1). doi:10.1093/nar/gkw1133
18. Hirschhorn JN. Genomewide Association Studies — Illuminating Biologic Pathways. *New England Journal of Medicine.* 2009;360(17). doi:10.1056/nejmp0808934
19. Grove ML, Yu B, Cochran BJ, et al. Best Practices and Joint Calling of the HumanExome BeadChip: The CHARGE Consortium. *PLoS ONE.* 2013;8(7). doi:10.1371/journal.pone.0068095
20. McClellan J, King MC. Genetic heterogeneity in human disease. *Cell.* 2010;141(2). doi:10.1016/j.cell.2010.03.032
21. Witte JS, Visscher PM, Wray NR. The contribution of genetic variants to disease depends on the ruler. *Nature Reviews Genetics.* 2014;15(11). doi:10.1038/nrg3786
22. Zhu M, Zhao S. Candidate gene identification approach: Progress and challenges. *International Journal of Biological Sciences.* 2007;3(7). doi:10.7150/ijbs.3.420

23. Bellamy R. Identifying genetic susceptibility factors for tuberculosis in Africans: A combined approach using a candidate gene study and a genome-wide screen. *Clinical Science*. 2000;98(3). doi:10.1042/cs0980245
24. Moore KJ. Utilization of mouse models in the discovery of human disease genes. *Drug Discovery Today*. 1999;4(3). doi:10.1016/S1359-6446(99)01304-5
25. Frank SA. Genetic variation of polygenic characters and the evolution of genetic degeneracy. *Journal of Evolutionary Biology*. 2003;16(1). doi:10.1046/j.1420-9101.2003.00485.x
26. Hutchison KE, Stallings M, McGeary J, Bryan A. Population Stratification in the Candidate Gene Study: Fatal Threat or Red Herring? *Psychological Bulletin*. 2004;130(1). doi:10.1037/0033-2909.130.1.66
27. Rees A, Stocks J, Shoulders CC, Galton DJ, Baralle FE. DNA POLYMORPHISM ADJACENT TO HUMAN APOPROTEIN A-1 GENE: RELATION TO HYPERTRIGLYCERIDAEMIA. *The Lancet*. 1983;321(8322). doi:10.1016/S0140-6736(83)91440-X
28. Tiffin N, Adie E, Turner F, et al. Computational disease gene identification: A concert of methods prioritizes type 2 diabetes and obesity candidate genes. *Nucleic Acids Research*. 2006;34(10). doi:10.1093/nar/gkl381
29. Brewster UC, Perazella MA. The renin-angiotensin-aldosterone system and the kidney: Effects on kidney disease. *American Journal of Medicine*. 2004;116(4). doi:10.1016/j.amjmed.2003.09.034
30. Carluccio M, Soccio M, De Caterina R. Aspects of gene polymorphisms in cardiovascular disease: The renin-angiotensin system. *European Journal of Clinical Investigation*. 2001;31(6). doi:10.1046/j.1365-2362.2001.00839.x
31. Rajagopalan S, Kurz S, Münzel T, et al. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation: Contribution to alterations of vasomotor tone. *Journal of Clinical Investigation*. 1996;97(8). doi:10.1172/JCI118623
32. Yokosawa H, Endo S, Ogura Y, Ishii S ichi. A new feature of angiotensin-converting enzyme in the brain: Hydrolysis of substance P. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1983;116(2). doi:10.1016/0006-291X(83)90586-7
33. Ned RM, Yesupriya A, Imperatore G, et al. The ACE I/D polymorphism in US adults: Limited evidence of association with hypertension-related traits

- and sex-specific effects by race/ethnicity. *American Journal of Hypertension*. 2012;25(2). doi:10.1038/ajh.2011.182
34. Costerousse O, Allegrini J, Lopez M, Alhenc-Gelas F. Angiotensin I-converting enzyme in human circulating mononuclear cells: Genetic polymorphism of expression in T-lymphocytes. *Biochemical Journal*. 1993;290(1). doi:10.1042/bj2900033
 35. Sayed-Tabatabaei FA, Oostra BA, Isaacs A, Van Duijn CM, Witteman JCM. ACE polymorphisms. *Circulation Research*. 2006;98(9). doi:10.1161/01.RES.0000223145.74217.e7
 36. Schmidt S, Van Hooft IMS, Grobbee DE, Ganten D, Ritz E. Polymorphism of the angiotensin i converting enzyme gene is apparently not related to high blood pressure: Dutch hypertension and offspring study. *Journal of Hypertension*. 1993;11(4). doi:10.1097/00004872-199304000-00003
 37. Jeunemaitre X, Lifton RP, Hunt SC, Williams RR, Lalouel JM. Absence of linkage between the angiotensin converting enzyme locus and human essential hypertension. *Nature Genetics*. 1992;1(1). doi:10.1038/ng0492-72
 38. Kario K. Angiotensinogen and angiotensin-converting enzyme genotypes, and day and night blood pressures in elderly Japanese hypertensives. *Hypertension Research - Clinical and Experimental*. 1999;22(2). doi:10.1291/hypres.22.95
 39. Staessen JA, Wang JG, Ginocchio G, et al. The deletion/insertion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene and cardiovascular-renal risk. In: *Journal of Hypertension*. Vol 15. ; 1997. doi:10.1097/00004872-199715120-00059
 40. Pfohl M, Athanasiadis A, Koch M, et al. Insertion/deletion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene is associated with coronary artery plaque calcification as assessed by intravascular ultrasound. *J Am Coll Cardiol*. 1998;31(5). doi:10.1016/S0735-1097(98)00044-8
 41. Rasmussen LM, Ledet T. Aortic atherosclerosis in diabetes mellitus is associated with an insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene No relation between the polymorphism and aortic collagen content. *Diabetologia*. 1996;39(6). doi:10.1007/s001250050497
 42. Sayed-Tabatabaei FA, Houwing-Duistermaat JJ, Van Duijn CM, Witteman JCM. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and carotid artery wall thickness: A meta-analysis. *Stroke*. 2003;34(7). doi:10.1161/01.STR.0000077926.49330.64

43. Dhar S, Ray S, Dutta A, Sengupta B, Chakrabarti S. Polymorphism of ACE gene as the genetic predisposition of coronary artery disease in Eastern India. *Indian Heart J.* 2012;64(6). doi:10.1016/j.ihj.2012.08.005
44. Moorthy N, Saligrama Ramegowda K, Jain S, et al. Role of Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) gene polymorphism and ACE activity in predicting outcome after acute myocardial infarction. *IJC Heart and Vasculature.* 2021;32. doi:10.1016/j.ijcha.2020.100701
45. Sharma P. Meta-analysis of the ACE gene in ischaemic stroke. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry.* 1998;64(2). doi:10.1136/jnnp.64.2.227
46. Arias-Vásquez A, Sayed-Tabatabaei FA, Schut AFC, et al. Angiotensin converting enzyme gene, smoking and mortality in a population-based study. *European Journal of Clinical Investigation.* 2005;35(7). doi:10.1111/j.1365-2362.2005.01515.x
47. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell.* 2020;181(2). doi:10.1016/j.cell.2020.02.052
48. Imai Y, Kuba K, Rao S, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature.* 2005;436(7047). doi:10.1038/nature03712
49. Dimmeler S, Rippmann V, Weiland U, Haendeler J, Zeiher AM. Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells: Protective effect of nitric oxide. *Circulation Research.* 1997;81(6). doi:10.1161/01.RES.81.6.970
50. Marshall RP, Gohlke P, Chambers RC, et al. Angiotensin II and the fibroproliferative response to acute lung injury. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology.* 2004;286(1). doi:10.1152/ajplung.00313.2002
51. Zheng H, Cao JJ. Angiotensin-Converting Enzyme Gene Polymorphism and Severe Lung Injury in Patients with Coronavirus Disease 2019. *American Journal of Pathology.* 2020;190(10). doi:10.1016/j.ajpath.2020.07.009
52. Tiret L, Rigat B, Visvikis S, et al. Evidence, from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels. *American Journal of Human Genetics.* 1992;51(1).
53. Marshall RP, Webb S, Bellingan GJ, et al. Angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphism is associated with susceptibility and outcome in acute respiratory distress syndrome. *American Journal of*

- Respiratory and Critical Care Medicine*. 2002;166(5).
doi:10.1164/rccm.2108086
54. Adamzik M, Frey U, Sixt S, et al. ACE I/D but not AGT (-6)A/G polymorphism is a risk factor for mortality in ARDS. *European Respiratory Journal*. 2007;29(3). doi:10.1183/09031936.00046106
 55. Itoyama S, Keicho N, Quy T, et al. ACE1 polymorphism and progression of SARS. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004;323(3). doi:10.1016/j.bbrc.2004.08.208
 56. Chan KCA, Tang NLS, Hui DSC, et al. Absence of association between angiotensin converting enzyme polymorphism and development of adult respiratory distress syndrome in patients with severe acute respiratory syndrome: A case control study. *BMC Infectious Diseases*. 2005;5. doi:10.1186/1471-2334-5-26
 57. Rong SS, Ma STU, Yu XT, et al. Genetic associations for keratoconus: a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*. 2017;7(1):4620. doi:10.1038/s41598-017-04393-2
 58. Sahebjada S, Schache M, Richardson AJ, et al. Evaluating the Association Between Keratoconus and the Corneal Thickness Genes in an Independent Australian Population. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2013;54(13):8224. doi:10.1167/iovs.13-12982
 59. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research*. 2002;30(6). doi:10.1093/nar/30.6.1292
 60. Cler L, Bu D, Lewis C, Euhus D. A comparison of five methods for extracting DNA from paucicellular clinical samples. *Molecular and Cellular Probes*. 2006;20(3-4). doi:10.1016/j.mcp.2005.12.003
 61. Lin MH, Tseng CH, Tseng CC, Huang CH, Chong CK, Tseng CP. Real-time PCR for rapid genotyping of angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism. *Clinical Biochemistry*. 2001;34(8). doi:10.1016/S0009-9120(01)00281-8
 62. Yamamoto N, Ariumi Y, Nishida N, et al. SARS-CoV-2 infections and COVID-19 mortalities strongly correlate with ACE1 I/D genotype. *Gene*. 2020;758. doi:10.1016/j.gene.2020.144944
 63. Gómez J, Albaiceta GM, García-Clemente M, et al. Angiotensin-converting enzymes (ACE, ACE2) gene variants and COVID-19 outcome. *Gene*. 2020;762. doi:10.1016/j.gene.2020.145102

64. Verma S, Abbas M, Verma S, et al. Impact of I/D polymorphism of angiotensin-converting enzyme 1 (ACE1) gene on the severity of COVID-19 patients. *Infection, Genetics and Evolution*. 2021;91. doi:10.1016/j.meegid.2021.104801
65. Bolli P, Sticchi E, Giusti B, Saracini C, Abbate R, Fatini C. Improvement in ACE I/D polymorphism detection. *JRAAS - Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*. 2011;12(3). doi:10.1177/1470320310381911
66. Kiso M, Moritsugu M, Imai M, et al. Rapid and cost-effective genotyping protocol for angiotensin-converting enzyme insertion/deletion (Ins/Del) polymorphism from saliva. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2019;42(8). doi:10.1248/bpb.b19-00110
67. Akey JM, Sosnoski D, Parra E, et al. Melting Curve Analysis of SNPs (McSNP[®]): A Gel-Free and Inexpensive Approach for SNP Genotyping. *Biotechniques*. 2001;30(2):358-367. doi:10.2144/01302tt05
68. Garritano S, Gemignani F, Voegelé C, et al. Determining the effectiveness of High Resolution Melting analysis for SNP genotyping and mutation scanning at the TP53 locus. *BMC Genetics*. 2009;10(1):5. doi:10.1186/1471-2156-10-5
69. Ohlander A, Zilio C, Hammerle T, et al. Genotyping of single nucleotide polymorphisms by melting curve analysis using thin film semi-transparent heaters integrated in a lab-on-foil system. *Lab on a Chip*. 2013;13(11):2075. doi:10.1039/c3lc50171j
70. Livshits, L. A.; Drozhzhyna, G. I.; Kucherenko, et al. Role of IL6 - 174 G/C, IL10 1082G/A and IL10 - 592C/A in the pathogenesis of keratoconus and development of recurrent erosion in Ukrainian patients with lattice corneal dystrophy. *EJOL*. 2020.<https://repo.odmu.edu.ua/xmlui/handle/123456789/8968>