

Ассоциация полиморфного маркера –23HphI гена *INS* с сахарным диабетом 1 типа

¹Никитин А.Г., ¹Лаврикова Е.Ю., ¹Серегин Ю.А., ²Зильберман Л.И., ²Цитлидзе Н.М., ²Кураева Т.Л., ²Петеркова В.А., ²Дедов И.И., ¹Носиков В.В.

¹ФГУП ГосНИИгенетика, Москва
(директор – к.б.н. М.Ю. Бебуров)

²ФГУ Эндокринологический научный центр, Москва
(директор – академик РАН и РАМН И.И. Дедов)

Цель. Для изучения ассоциации с сахарным диабетом 1 типа (СД1) проведен сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера –23HphI гена *INS*, кодирующего проинсулин.

Материалы и методы. В исследование включены две группы больных СД1 и здоровых индивидов, генотипирование проводилось с помощью амплификации «в реальном времени».

Результаты. Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера –23HphI гена *INS* показал наличие ассоциации с СД1.

Заключение. С помощью метода «случай–контроль» найдена ассоциация полиморфного маркера –23HphI гена *INS* у русских больных СД1.

Ключевые слова: сахарный диабет 1 типа, полиморфный маркер, 23HphI, *INS*, ассоциация

Association of –23 HphI, a polymorphic marker of the *INS* gene, with type 1 diabetes mellitus

¹Nikitin A.G., ¹Lavrikova E.Yu., ¹Seregin Yu.A., ²Zil'berman L.I., ²Tsitlidze N.M., ²Kuraeva T.L., ²Peterkova V.A., ²Dedov I.I., ¹Nosikov V.V.

¹State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow

²Endocrinological Research Centre, Moscow

Aim. To analyse frequency distribution of alleles and genotypes of –23 HphI, a polymorphic marker of the *INS* gene, for evaluation of its association with DM1.

Materials and methods. The study included two group of subjects: healthy ones and DM1 patients. Genotyping was performed by “real time” amplification.

Results. Comparative analysis demonstrated association between –23 HphI polymorphic marker of *INS* gene, and type 1 diabetes mellitus.

Conclusion. The use of the case-control method revealed association of –23 HphI, a polymorphic marker of the *INS* gene, with type 1 diabetes mellitus.

Key words: type 1 diabetes mellitus, polymorphic marker, –23 HphI, *INS*, association

Сахарный диабет 1 типа (СД1) является многофакторным заболеванием, вызываемым аутоиммунным разрушением β-клеток, которое приводит к полному прекращению эндогенного синтеза инсулина [1]. В развитии СД1 играют существенную роль как генетические факторы, так и факторы окружающей среды [2]. Исследования аутопсийного материала ткани поджелудочной железы показали, что разрушение β-клеток вызывается лимфоцитарной инфильтрацией островков Лангерганса дендритными клетками (DC), макрофагами и Т-лимфоцитами (CD4⁺ и CD8⁺). При этом не затрагиваются α-клетки, секретирующие глюкагон, и δ-клетки, секретирующие соматостатин [3]. Еще одним доказательством развития именно аутоиммунного процесса являются выявляемые в сыворотке крови антитела, специфичные для собственных белков организма [4], самые важные из которых представлены антителами к инсулину, GAD65 (декарбоксилаза глутаминовой кислоты) и IA2 (внутриклеточная тирозинфосфатаза). В патогенез СД1 вовлечены оба типа Т-лимфоцитов, при этом Т-хелперы (CD4⁺) распознают внеклеточные антигены (связанные с МНС класса II) и стимулируют воспаление посредством высвобождения цитокинов, а цитотоксические Т-лимфоциты (CD8⁺) реагируют на эндогенные антигены (возможно, вирусные, связанные с МНС класса I) и уничтожают клетки-мишени.

К моменту манифестации заболевания значительная часть β-клеток уже оказывается уничтоженной, таким образом, прогноз риска развития заболевания и предупреждение возникновения СД1 являются ключевыми задачами, и понимание механизмов развития патологии может существенно приблизить к решению этих вопросов.

Более 30 лет назад были получены первые свидетельства вовлеченности хромосомной области 6p21, содержащей гены главного комплекса гистосовместимости (МНС) в развитие СД1 [5]. К началу эпохи полных геномных поисков было установлено и подтверждено как минимум четыре локуса предрасположенности к СД1:

локус МНС (6p21) [5–9], ген проинсулина *INS* (11p15) [10–14], ген *CTLA4* (2q31–q33) [15–17] и ген *PTPN22* (1p13) [18–21], при этом было показано, что локусы *HLA* и *INS* определяют около 60–70% генетического риска развития СД1.

Ассоциацию с СД1 локуса *INS* объясняли разным числом повторов мини-сателлитного тандемного повтора VNTR, расположенного в 596 п.н. от гена *INS* в его промоторной области [13, 22–25]. Число повторов в составе VNTR может изменяться от 26 до более чем 200. В зависимости от их числа аллели VNTR (*variable numbers of tandem repeat* – тандемные повторы с изменяющимся числом копий) подразделяют на 3 класса. Аллели класса I содержат от 26 до 63 повторяющихся единиц, тогда как аллели класса III включают от 141 до 209 звеньев (рис. 1). Промежуточный по длине класс II редко встречается у европеоидов и состоит из аллелей, содержащих около 80 тандемных повторов [26]. В ряде работ была показана ассоциация определенных аллелей VNTR с уровнем экспрессии гена инсулина в тимусе и в β-клетках [23–25, 27–29]. У индивидов, носителей аллелей класса III уровень мРНК проинсулина в тимусе в 2–3 раза превышает аналогичные показатели у носителей аллелей класса I [13]. Предполагается, что более высокие уровни экспрессии гена *INS* в тимусе способствуют развитию центральной толерантности, что может объяснять защитную роль этого некодирующего полиморфного маркера. Во многих исследованиях для идентификации аллелей VNTR использовался полиморфный маркер –23HphI (dbSNP rs689) гена *INS*, который находится в полном неравновесии по сцеплению с VNTR, но, возможно, обладает также и независимым биологическим эффектом. Для русской популяции подобных исследований ассоциации полиморфного маркера –23HphI с СД1 до сих пор не проводилось.

В настоящем исследовании была поставлена задача изучить ассоциацию полиморфного маркера –23HphI гена *INS* с СД1 у русских больных, проживающих в Москве.

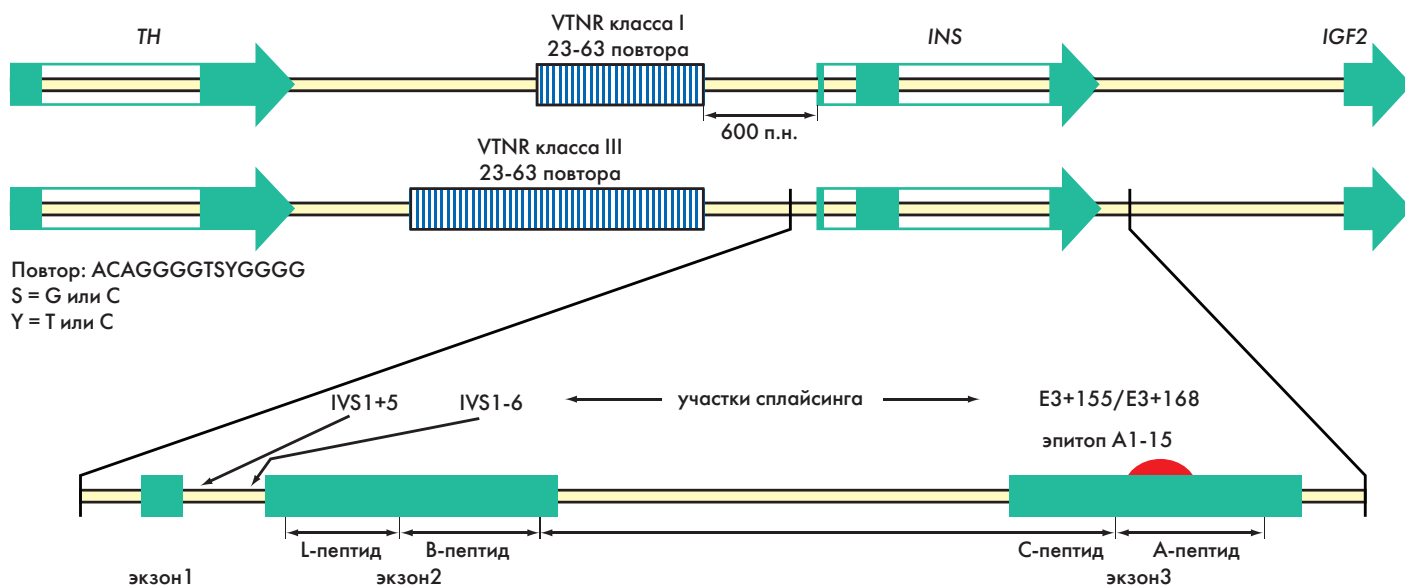


Рис. 1. Схема альтернативного сплайсинга гена *INS*. Участки сплайсинга обозначены согласно работе [27]. Участок сплайсинга IVS1-6 соответствует полиморфному маркеру –*23HphI* гена *INS*. Транскрипты, не содержащие участка, кодирующего эпитоп A1-15, образуются при альтернативном сплайсинге по участкам E3+155/E3+168

Материалы и методы

В работе использовали образцы крови от двух групп больных СД1 (177 человек) и здоровых индивидов (206 человек) русского происхождения, любезно предоставленные сотрудниками ФГУ Эндокринологический научный центр (г. Москва).

Использовали термостабильную ДНК-полимеразу Taq производства ЗАО «Диалат» (г. Москва). Олигонуклеотидные праймеры синтезированы ЗАО «Евроген» (г. Москва). Флуоресцентные зонды синтезированы ООО «ДНК-Синтез» (г. Москва). Геномную ДНК выделяли из цельной крови больных посредством экстракции фенолом-хлороформом после инкубации образцов крови с протеиназой К в присутствии 0,1% додецилсульфата натрия [30].

Аmplификацию полиморфного участка –*23HphI* гена *INS* проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) «в реальном времени» на термоциклере «ABI 7500 Fast» (Applied Biosystems) в 20 мкл реакционной смеси следующего состава: 70 мМ Трис-НСl, рН 8,8, 16,6 мМ сульфата аммония, 0,01-процентный Твин-20, 2 мМ хлорида магния, 200 нМ каждого dNTP, 500 нМ праймеров (INS-1-FJ, 5'-ttccccgcactagtagag-3' и INS-1-RJ, 5'-agggcactgtgctcag-3'), 100 нМ зондов (INS-1-FAM, FAM-5'-ccctgctgtctcccagatcactg-3'-BHQ1 и INS-1-VIC, VIC-5'-ccctgctgtcaccagatcactg-3'-BHQ1) 1,5 ед. Taq ДНК-полимеразы, 50–100 нг геномной ДНК. Условия амплификации фрагмента ДНК: 95° С/2 мин – 1-й цикл; 94° С/10 сек, 60° С/60 – 40 циклов. Размер продукта амплификации – 197 п.н. Анализ продуктов амплификации проводился методом детекции «по конечной точке» с помощью встроенных средств программного обеспечения версии SDS 1.4.

Статистический анализ распределения частот и генотипов проводили с использованием таблиц сопряженности и критерия хи-

квадрат (χ^2). Достоверными считали различия при $p < 0,05$. Для описания относительного риска развития заболевания рассчитывали относительный риск (OR). OR=1 рассматривали как отсутствие ассоциации, OR>1 – как положительную ассоциацию (повышенный риск развития патологии), OR<1 – как отрицательную ассоциацию аллеля или генотипа с заболеванием (пониженный риск развития патологии). Доверительный интервал (CI, confidence interval) представляет собой интервал значений, в пределах которого с вероятностью 95% находится ожидаемое значение рассматриваемого параметра, в данном случае – значение OR. Вычисления производили с помощью программы «Калькулятор для расчета статистики в исследованиях "случай-контроль"» [31].

Результаты и обсуждение

Распределение частот генотипов полиморфного маркера –*23HphI* (A/T) гена *INS* в группе здоровых индивидов русского происхождения соответствовало распределению Харди-Вайнберга, существенных отличий от частот аллелей и генотипов в европейской популяции обнаружено не было. Этот полиморфный маркер находится в интрон 1 гена *INS* в 6 п.н. от 3'-участка сплайсинга первого интрона.

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера –*23HphI* гена *INS* выявил статистически значимые различия в группе больных СД1 и группе здоровых индивидов. Достоверное увеличение частоты аллеля А (OR=2,03; $p=4,0 \times 10^{-5}$) в группе больных СД1 говорит об ассоциации аллеля А с повышенным риском развития данной патологии и повышенном риске развития СД1 у носителей генотипа АА (OR=2,03; $p=3,7 \times 10^{-4}$) (табл. 1). В то же время была установлена ассоциация аллеля Т с по-

Таблица 1

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера –*23HphI* гена *INS* в группах больных СД1 (T1DM+) и здоровых индивидов (T1DM–)

Аллели и генотипы	Частота аллелей и генотипов		Значение χ^2	Уровень значимости p	OR	
	T1DM+ n=177	T1DM– n=206			Значение	CI 95%
Аллель А	81,6%	68,7%	16,88	$4,0 \times 10^{-5}$	2,03	1,44 - 2,85
Аллель Т	18,4%	31,23%			0,49	0,35 - 0,69
Генотип АА	66,7%	49,5%	15,82	$3,7 \times 10^{-4}$	2,04	1,35 - 3,09
Генотип АТ	29,9%	38,3%			0,69	0,45 - 1,05
Генотип ТТ	3,4%	12,1%			0,25	0,10 - 0,63

ниженным риском развития СД1 ($OR=0,49$, $p=4,0 \times 10^{-5}$), что свидетельствует о корреляции носительства генотипа ТТ ($OR=0,25$; $p=3,7 \times 10^{-4}$) со сниженным риском развития этого заболевания. Таким образом, можно сделать вывод, что полиморфный маркер $-23HphI$ гена *INS* у русских ассоциирован с СД1.

Ген *INS* находится в хромосомной области 11p15.5 между генами тирозингидроксилазы (*TH*) и инсулиноподобного фактора роста II (*IGF2*) (рис. 1). Несмотря на множество исследований по изучению ассоциации с СД1 области VNTR, с которой связывается транскрипционный фактор Pur1, что, собственно, и влияет на уровень экспрессии инсулина, нельзя исключить возможного независимого влияния однонуклеотидных полиморфных маркеров, таких как $-23HphI$, *A1140C* и ряда других, на развитие заболевания.

Полиморфный маркер $-23HphI$ расположен в полипиримидиновом тракте, служащем сигналом для сплайсинга 3'-конца интрона 1, который разделяет кодирующей и некодирующей экзон. Замена А на Т может влиять на эффективность сплайсинга и приводить к появлению транскриптов с более длинным 5'-нетранслируемым участком, что в свою очередь может влиять на эффективность трансляции мРНК [32]. Различия в длинах транскриптов гена *INS* уже обнаруживали ранее, но авторы не обсуждали данные наблюдения [33]. В 2006 г. была предпринята попытка выяснить влияние полиморфного маркера $-23HphI$ на транскрипцию гена *INS* [27]. Обнаружено 6 различных изоформ мРНК, три из которых подвергались правильному сплайсингу интрона 2, а три были лишены 5'-конца экзона 3 (кодирует С-пептид и А-цепь инсулина), что подтвердило более ранние наблюдения [28]. Вариант с заменой Т содержал значительно меньше нефункциональных изоформ с отсутствующим экзонем 2 и оставшимся интроном 1, чем вариант с аллелем А, что говорит о более эффективном сплайсинге пре-мРНК, содержащей аллель Т полиморфного маркера $-23HphI$. Эксперименты с клеточными линиями (клетки 293Т и линии, полученные из β -клеток) показали, что пре-мРНК с аллелем Т дает большее относительное содержание полнофункционального транскрипта проинсулина и более низкий уровень экспрессии, в то время как аллель А приводит к повышению экспрессии и к большему разнообразию изоформ. Недавно было обнаружено, что клонированные Т-лимфоциты, взятые у пациентов с СД1 и с предрасполагающим гаплотипом DR4, специфически узнают эпитоп А1-15 проинсулина [34–36]. Эти 15 аминокислот А-пептида кодируются 5'-концом экзона 3, который отсутствует в ряде изоформ, что, возможно, может влиять на развитие аутоиммунной толерантности (рис. 1). Несмотря на подтверждение эффекта альтернативного сплайсинга [29], необходимы дальнейшие эксперименты для выяснения тканеспеци-

фичных профилей экспрессии у человека, так как повышенная экспрессия большого количества изоформ проинсулина в β -клетках, которая ассоциирована с аллелем А, может стимулировать аутоиммунный ответ, а различные уровни экспрессии в поджелудочной железе и тимусе могут объяснить влияние генетических факторов на развитие СД1 [37]. Возможно, предрасполагающая роль аллеля А и сцепленного с ним VNTR класса I объясняется пониженной экспрессией изоформ проинсулина в тимусе (но не в β -клетках) и снижением эффективности центральной толерантности против всех возможных эпитопов инсулина, представляемых β -клетками. На участие именно антигенных детерминант инсулина в развитии СД1 указывает тот факт, что ассоциации полиморфных маркеров гена *INS* с СД2 типа (СД2) обнаружено не было, и, вероятно, различия в уровнях экспрессии проинсулина носителями различных генотипов VNTR и полиморфного маркера $-23HphI$ гена *INS* регулируются компенсаторными механизмами и не влияют на возникновение СД1 [38].

Непосредственным применением знаний об этом локусе является возможность использовать данные генотипирования для прогноза реакции на ввод инсулина, предполагаемого главного аутоантигена для СД1 [39], для стимулирования толерантности. Орально введенный инсулин, попадая в желудочно-кишечную иммунную систему, предотвращает диабет у мышей линии NOD, но для людей подобные попытки терапии оказались безуспешными (исследование Diabetes Prevention Trial 1, DPT-1, [40]). Последующий углубленный анализ показал наличие положительного эффекта у пациентов с высоким титром аутоантител к инсулину [41]. Этот результат является крайне интересным, так как показано, что предрасполагающий генотип локуса VNTR, так же как и маркера $-23HphI$ гена *INS*, ассоциирован с повышенным уровнем аутоантител к инсулину у пациентов с СД1 [42]. Возможность использования биомаркеров в индивидуализированной терапии в настоящее время тестируется в многоцентровом исследовании в рамках программы Type 1 Diabetes TrialNet [43]. Когда мы станем лучше понимать роль инсулина в развитии СД1, станет возможно на основании генетического анализа локуса *INS* проводить персонализированную терапию, направленную на стимулирование толерантности к инсулину.

Изучение ассоциации полиморфных маркеров гена *INS* ускорило исследование тканеспецифичной экспрессии аутоантигенов в тимусе [44], что открывает путь к развитию новых терапевтических подходов. Недавно были выделены и охарактеризованы клеточные линии клеток эпителия тимуса, экспрессирующих инсулин, это позволит выяснить механизм контроля транскрипции гена *INS* в тимусе (сильно отличающейся от такового в β -клетках) и даст возможность применять методы клинической медицины в терапии СД1 [45].

Литература

- Devendra D., Liu E., Eisenbarth G.S. Type 1 diabetes: recent developments // *BMJ*. – 2004. – 328 (7442). – P. 750–754.
- Knip M., Veijola R., Virtanen S.M., Hyöty H., Vaarala O., Akerblom H.K. Environmental triggers and determinants of type 1 diabetes // *Diabetes*. – 2005. – 54 Suppl. 2. – P. S125–136.
- Foulis A.K. The pathology of the endocrine pancreas in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus // *APMIS*. – 1996. – 104 (3). – P. 161–167.
- Miao D., Yu L., Eisenbarth G.S. Role of autoantibodies in type 1 diabetes // *Front. Biosci.* – 2007. – 12. – P. 1889–1898.
- Nerup J., Platz P., Andersen O.O., Christy M., Lyngsoe J., Poulsen J.E., Ryder L.P., Thomsen M., Nielsen L.S., Svejgaard A. HL-A ANTIGENS AND DIABETES MELLITUS // *The Lancet*. – 1974. – 304 (7885). – P. 864–866.
- Noble J.A., Valdes A.M., Cook M., Klitz W., Thomson G., Erlich H.A. The role of HLA class II genes in insulin-dependent diabetes mellitus: molecular analysis of 180 Caucasian, multiplex families // *Am. J. Hum. Genet.* – 1996. – 59 (5). – P. 1134–1148.
- Cucca F., Lampis R., Congia M., Angius E., Nutland S., Bain S.C., Barnett A.H., Todd J.A. A correlation between the relative predisposition of MHC class II alleles to type 1 diabetes and the structure of their proteins // *Hum. Mol. Genet.* – 2001. – 10 (19). – P. 2025–2037.
- Kelly M.A., Rayner M.L., Mijovic C.H., Barnett A.H. Molecular aspects of type 1 diabetes // *Mol Pathol.* – 2003. – 56 (1). – P. 1–10.
- Devendra D., Eisenbarth G.S. 17. Immunologic endocrine disorders // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2003. – 111 (2 Suppl). – P. S624–636.
- Bell G.I., Horita S., Karam J.H. A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus // *Diabetes*. – 1984. – 33 (2). – P. 176–183.
- Owerbach D., Gabbay K.H. Linkage of the VNTR/insulin-gene and type I diabetes mellitus: increased gene sharing in affected sibling pairs // *Am. J. Hum. Genet.* – 1994. – 54 (5). – P. 909–912.
- Lucassen A.M., Julier C., Beressi J., Boitard C., Froguel P., Lathrop M., Bell J.I. Susceptibility to insulin dependent diabetes mellitus maps to a 4.1 kb segment of DNA spanning the insulin gene and associated VNTR // *Nat. Genet.* – 1993. – 4 (3). – P. 305–310.
- Bennett S.T., Lucassen A.M., Gough S.C., Powell E.E., Undlien D.E., Pritchard L.E., Merriman M.E., Kawaguchi Y., Dronsfield M.J., Pociot F. Susceptibility to human type 1 diabetes at IDDM2 is determined by tandem repeat variation at the insulin gene minisatellite locus // *Nat. Genet.* – 1995. – 9 (3). – P. 284–292.

14. Undlien D.E., Bennett S.T., Todd J.A., Akselsen H.E., Ikäheimo I., Reijonen H., Knip M., Thorsby E., Rønningen K.S. Insulin gene region-encoded susceptibility to IDDM maps upstream of the insulin gene // *Diabetes*. – 1995. – 44 (6). – P. 620–625.
15. Kristiansen O.P., Larsen Z.M., Pociot F. CTLA-4 in autoimmune diseases—a general susceptibility gene to autoimmunity? // *Genes Immun.* – 2000. – 1 (3). – P. 170–184.
16. Ueda H., Howson J.M.M., Esposito L., Heward J., Snook, Chamberlain G., Rainbow D.B., Hunter K.M.D., Smith A.N., Di Genova G., Herr M.H., Dahlman I., Payne F., Smyth D., Lowe C., Twells R.C.J., Howlett S., Healy B., Nutland S., Rance H.E., Everett V., Smink L.J., Lam A.C., Cordell H.J., Walker N.M., Bordin C., Hulme J., Motzo C., Cucca F., Hess J.F., Metzker M.L., Rogers J., Gregory S., Allahabadia A., Nithiyananthan R., Tuomilehto-Wolf E., Tuomilehto J., Bingley P., Gillespie K.M., Undlien D.E., Ronningen K.S., Guja C., Ionescu-Tirgoviste C., Savage D.A., Maxwell A.P., Carson D.J., Patterson C.C., Franklyn J.A., Clayton D.G., Peterson L.B., Wicker L.S., Todd J.A., Gough S.C.L. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease // *Nature*. – 2003. – 423 (6939). – P. 506–511.
17. Nistico L., Buzzetti R., Pritchard L., Van der Auwera B., Giovannini C., Bosi E., Larrad M., Rios M., Chow C., Cockram C., Jacobs K., Mijovic S., Bain S., Barnett A., Vandewalle C., Schuit F., Gorus F., Tosi R., Pozzilli P., Todd J. The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. Belgian Diabetes Registry // *Hum. Mol. Genet.* – 1996. – 5 (7). – P. 1075–1080.
18. Smyth D., Cooper J.D., Collins J.E., Heward J.M., Franklyn J.A., Howson J.M.M., Vella A., Nutland S., Rance H.E., Maier L., Barratt B.J., Guja C., Ionescu-Tirgoviste C., Savage D.A., Dunger D.B., Widmer B., Strachan D.P., Ring S.M., Walker N., Clayton D.G., Twells R.C.J., Gough S.C.L., Todd J.A. Replication of an association between the lymphoid tyrosine phosphatase locus (LYP/PTPN22) with type 1 diabetes, and evidence for its role as a general autoimmunity locus // *Diabetes*. – 2004. – 53 (11). – P. 3020–3023.
19. Onengut-Gumuscu S., Ewens K.G., Spielman R.S., Concannon P. A functional polymorphism (1858C/T) in the PTPN22 gene is linked and associated with type 1 diabetes in multiplex families // *Genes Immun.* – 2004. – 5 (8). – P. 678–680.
20. Bottini N., Musumeci L., Alonso A., Rahmouni S., Nika K., Rostamkhani M., MacMurray J., Meloni G.F., Lucarelli P., Pellicchia M., Eisenbarth G.S., Comings D., Mustelin T. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type 1 diabetes // *Nat. Genet.* – 2004. – 36 (4). – P. 337–338.
21. Qu H., Tessier M., Hudson T.J., Polychronakos C. Confirmation of the association of the R620W polymorphism in the protein tyrosine phosphatase PTPN22 with type 1 diabetes in a family based study // *J. Med. Genet.* – 2005. – 42 (3). – P. 266–270.
22. Kennedy G.C., German M.S., Rutter W.J. The minisatellite in the diabetes susceptibility locus IDDM2 regulates insulin transcription // *Nat. Genet.* – 1995. – 9 (3). – P. 293–298.
23. Vafiadis P., Bennett S.T., Todd J.A., Nadeau J., Grabs R., Goodyer C.G., Wickramasinghe S., Colle E., Polychronakos C. Insulin expression in human thymus is modulated by INS VNTR alleles at the IDDM2 locus // *Nat. Genet.* – 1997. – 15 (3). – P. 289–292.
24. Pugliese A., Zeller M., Fernandez A., Zalberg L.J., Bartlett R.J., Ricordi C., Pietropaolo M., Eisenbarth G.S., Bennett S.T., Patel D.D. The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variation at the INS VNTR-IDDM2 susceptibility locus for type 1 diabetes // *Nat. Genet.* – 1997. – 15 (3). – P. 293–297.
25. Le Stunff C., Fallin D., Schork N.J., Bougnères P. The insulin gene VNTR is associated with fasting insulin levels and development of juvenile obesity // *Nat. Genet.* – 2000. – 26 (4). – P. 444–446.
26. Bell G.I., Selby M.J., Rutter W.J. The highly polymorphic region near the human insulin gene is composed of simple tandemly repeating sequences // *Nature*. – 1982. – 295 (5844). – P. 31–35.
27. Královicová J., Gaunt T.R., Rodriguez S., Wood P.J., Day I.N.M., Vorechovsky I. Variants in the human insulin gene that affect pre-mRNA splicing: is –23HphI a functional single nucleotide polymorphism at IDDM2? // *Diabetes*. – 2006. – 55 (1). – P. 260–264.
28. Laub O., Rutter W. Expression of the human insulin gene and cDNA in a heterologous mammalian system // *J. Biol. Chem.* – 1983. – 258 (10). – P. 6043–6050.
29. Marchand L., Polychronakos C. Evaluation of polymorphic splicing in the mechanism of the association of the insulin gene with diabetes // *Diabetes*. – 2007. – 56 (3). – P. 709–713.
30. Johns M.B., Paulus-Thomas J.E. Purification of human genomic DNA from whole blood using sodium perchlorate in place of phenol // *Anal. Biochem.* – 1989. – 180 (2). – P. 276–278.
31. Калькулятор для расчета статистики в исследованиях "случай-контроль" [http://test.tapatili.ru/calculator_or.php].
32. Kozak M. Leader length and secondary structure modulate mRNA function under conditions of stress // *Mol. Cell. Biol.* – 1988. – 8 (7). – P. 2737–2744.
33. Sospedra M., Ferrer-Francesch X., Dom'nguez O., Juan M., Foz-Sala M., Pujol-Borrell R. Transcription of a broad range of self-antigens in human thymus suggests a role for central mechanisms in tolerance toward peripheral antigens // *J. Immunol.* – 1998. – 161 (11). – P. 5918–5929.
34. Kent S.C., Chen Y., Bregoli L., Clemmings S.M., Kenyon N.S., Ricordi C., Hering B.J., Hafler D.A. Expanded T cells from pancreatic lymph nodes of type 1 diabetic subjects recognize an insulin epitope // *Nature*. – 2005. – 435 (7039). – P. 224–228.
35. Hassainya Y., Garcia-Pons F., Kratzer R., Lindo V., Greer F., Lemonnier F.A., Niedermann G., van Ender P.M. Identification of naturally processed HLA-A2-restricted proinsulin epitopes by reverse immunology // *Diabetes*. – 2005. – 54 (7). – P. 2053–2059.
36. Kent S., Hafler D. OR.72. Enhanced Recognition of Insulin a Chain 1-15 By Expanded T-Cell Clones from Human Type 1 Diabetic (T1D) Pancreatic Draining Lymph Nodes // *Clinical Immunology*. – 2006. – 119 (Supplement 1). – P. S30–S31.
37. Pugliese A., Brown D., Garza D., Murchison D., Zeller M., Redondo M.J., Redondo M., Diez J., Eisenbarth G.S., Patel D.D., Ricordi C. Self-antigen-presenting cells expressing diabetes-associated autoantigens exist in both thymus and peripheral lymphoid organs // *J. Clin. Invest.* – 2001. – 107 (5). – P. 555–564.
38. Hansen S.K., Gjesing A.P., Rasmussen S.K., Glümer C., Urhammer S.A., Andersen G., Rose C.S., Drivsholm T., Torekov S.K., Jensen D.P., Ekstrøm C.T., Borch-Johnsen K., Jørgensen T., McCarthy M.I., Hansen T., Pedersen O. Large-scale studies of the HphI insulin gene variable-number-of-tandem-repeats polymorphism in relation to Type 2 diabetes mellitus and insulin release // *Diabetologia*. – 2004. – 47 (6). – P. 1079–1087.
39. Nakayama M., Abiru N., Moriyama H., Babaya N., Liu E., Miao D., Yu L., Wegmann D.R., Hutton J.C., Elliott J.F., Eisenbarth G.S. Prime role for an insulin epitope in the development of type1 diabetes in NOD mice // *Nature*. – 2005. – 435 (7039). – P. 220–223.
40. Schatz D.A., Bingley P.J. Update on major trials for the prevention of type 1 diabetes mellitus: the American Diabetes Prevention Trial (DPT-1) and the European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial (ENDIT) // *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* – 2001. – 14 Suppl 1. – P. 619–622.
41. Skyler J.S., Krischer J.P., Wolfsdorf J., Cowie C., Palmer J.P., Greenbaum C., Cuthbertson D., Rafkin-Mervis L.E., Chase H.P., Leschek E. Effects of oral insulin in relatives of patients with type 1 diabetes: The Diabetes Prevention Trial-Type 1 // *Diabetes Care*. – 2005. – 28 (5). – P. 1068–1076.
42. Hermann R., Laine A., Veijola R., Vahlberg T., Simell S., Lähde J., Simell O., Knip M., Ilonen J. The effect of HLA class II, insulin and CTLA4 gene regions on the development of humoral beta cell autoimmunity // *Diabetologia*. – 2005. – 48 (9). – P. 1766–1775.
43. Skyler J.S., Greenbaum C.J., Lachin J.M., Leschek E., Rafkin-Mervis L., Savage P., Spain L. Type 1 Diabetes TrialNet—an international collaborative clinical trials network // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2008. – 1150. – P. 14–24.
44. Kyewski B., Derbinski J. Self-representation in the thymus: an extended view // *Nat. Rev. Immunol.* – 2004. – 4 (9). – P. 688–698.
45. Palumbo M.O., Levi D., Chentoufi A.A., Polychronakos C. Isolation and characterization of proinsulin-producing medullary thymic epithelial cell clones // *Diabetes*. – 2006. – 55 (9). – P. 2595–2601.

Никитин Алексей Георгиевич

к.б.н., научный сотрудник, ФГУП ГосНИИГенетика, Москва

E-mail: nikitin@genetika.ru

Лаврикова Елена Юрьевна

аспирант, ФГУП ГосНИИГенетика, Москва

Серегин Юрий Александрович

к.б.н., старший научный сотрудник, ФГУП ГосНИИГенетика, Москва

Зильберман Любовь Иосифовна

к.м.н., старший научный сотрудник, ФГУ Эндокринологический научный центр, Москва

Цитлидзе Нана Михайловна

к.м.н., научный сотрудник ФГУП ГосНИИГенетика, Москва

Кураева Тамара Леонидовна

д.м.н., профессор, зав. отделением сахарного диабета Института детской эндокринологии,

ФГУ Эндокринологический научный центр, Москва

Петеркова Валентина Александровна

д.м.н., профессор, директор Института детской эндокринологии, ФГУ Эндокринологический научный центр, Москва

Носиков Валерий Вячеславович

д.м.н., профессор, ФГУП ГосНИИГенетика, Москва