

## РАСПРЕДЕЛЕНИЕ АЛЛЕЛЕЙ MICA В РОССИЙСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

Каневский Л.М.<sup>1</sup>, Гречихина М.В.<sup>1</sup>, Кузьмина Е.Г.<sup>2</sup>,  
Мушкарина Т.Ю.<sup>2</sup>, Спелков А.А.<sup>1</sup>, Стрельцова М.А.<sup>1</sup>,  
Коваленко Е.И.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова»  
Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup> Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Научный медицинский  
исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Россия

**Резюме.** Под влиянием стрессовых факторов, инфекций, опухолевой трансформации на поверхности клеток организма экспрессируется белок MICA, который является лигандом к рецептору NKG2D NK- и Т-клеток. Взаимодействие рецептора NKG2D на поверхности клеток иммунной системы с MICA приводит к активации лимфоцитов и уничтожению носителя лиганда. Ген MICA отличается высоким уровнем полиморфизма. К настоящему времени описано 87 аллелей, продукты которых различаются по способности активировать цитотоксические лимфоциты, что может оказывать влияние на протекание ряда заболеваний, таких как рак, вирусные инфекции, аутоиммунные заболевания. Распределения аллелей MICA в разных этносах существенно различаются. Анализ полиморфизма MICA в данном этносе необходим для выявления взаимосвязей между определенными аллелями MICA и теми или иными заболеваниями. Данная работа направлена на исследование распределения аллелей MICA среди населения России.

Типирование MICA проводили по методике, предложенной Yizhou Zoe и Peter Stastny. Методика включала в себя: 1) выделение геномной ДНК из цельной донорской крови; 2) ПЦР с целью амплификации фрагмента гена MICA; 3) секвенирование полученных ПЦР-фрагментов. Анализ результатов секвенирования проводили с использованием программ Vector NTI и Chromas Lite.

Был определен генотип аллелей MICA 119 доноров. Из 87 описанных в литературе аллелей MICA среди исследованных образцов обнаружено 15. Частоты встречаемости аллелей MICA оказались следующими: \*002 – 19,3%, \*004 – 6,7%, \*007 – 3,0%, \*008 – 35,7%, \*009 – 10,1%, \*010 – 5,0%, \*011 – 3,8%, \*012 – 2,1%, \*016 – 2,5%, \*017 – 3,4%, \*018 – 5,5%, \*019 – 0,4%, \*027 – 1,3%, \*053 – 0,8%, \*068 – 0,4%. Выяснилось, что распределение аллелей MICA в России сходно с таковыми для европейских стран. При сопоставлении литературных данных по разным странам мира выяснилось, что различия в распределении аллелей MICA выражены преимущественно между расами, а не нациями.

В данной работе проанализировано распределение аллелей MICA у россиян. Оно оказалось весьма сходным с таковыми у представителей других европейских стран и имеет ряд существенных отличий

### Адрес для переписки:

Каневский Леонид Михайлович  
ФГБУН «Институт биоорганической химии имени  
академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова»  
Российской академии наук  
117997, Россия, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая,  
16/10.  
Тел.: 8 (917) 552-27-22.  
Факс: 8 (495) 335-08-12.  
E-mail: leonid\_kanewski@mail.ru

### Address for correspondence:

Kanewskiy Leonid M.  
Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,  
Russian Academy of Sciences  
117997, Russian Federation, Moscow, GSP-7,  
Miklukho-Maklai str., 16/10.  
Phone: 7 (917) 552-27-22.  
Fax: 7 (495) 335-08-12.  
E-mail: leonid\_kanewski@mail.ru

### Образец цитирования:

Л.М. Каневский, М.В. Гречихина, Е.Г. Кузьмина,  
Т.Ю. Мушкарина, А.А. Спелков, М.А. Стрельцова,  
Е.И. Коваленко «Распределение аллелей MICA  
в российской популяции» // Медицинская иммунология,  
2019. Т. 21, № 5. С. 959-964.  
doi: 10.15789/1563-0625-2019-5-959-964  
© Каневский Л.М. и соавт., 2019

### For citation:

L.M. Kanewskiy, M.V. Grechikhina, E.G. Kuzmina,  
T.Yu. Mushkarina, A.A. Spelkov, M.A. Streltsova,  
E.I. Kovalenko "Distribution of MICA alleles in the Russian  
population", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya  
Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 5, pp. 959-964.  
doi: 10.15789/1563-0625-2019-5-959-964  
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-5-959-964

от этносов монголоидной расы (Япония, Китай, Корея). Анализ распределения аллелей *MICA* в российской популяции может оказаться полезен для выявления предрасположенности индивидов к тем или иным заболеваниям.

*Ключевые слова:* МНС, *MICA*, *NKG2D*, генотипирование, секвенирование, популяционный анализ

## DISTRIBUTION OF *MICA* ALLELES IN THE RUSSIAN POPULATION

Kanevskiy L.M.<sup>a</sup>, Grechikhina M.V.<sup>a</sup>, Kuzmina E.G.<sup>b</sup>,  
Mushkarina T.Yu.<sup>b</sup>, Spelkov A.A.<sup>a</sup>, Streltsova M.A.<sup>a</sup>, Kovalenko E.I.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> A. Tsyb Medical Radiological Research Center – Branch of National Medical Research Radiological Center, Obninsk, Russian Federation

**Abstract.** Stress factors, infections, tumor transformation of the cells of organism induce the expression of *MICA* protein, which is a ligand for the *NKG2D* receptor of NK and T cells. The interaction of the *NKG2D* receptor on the surface of the cells of the immune system with *MICA* results in activation of lymphocytes and elimination of the ligand carrier. The *MICA* gene has a high level of polymorphism. To date, 87 alleles have been described; their products differ in ability to activate cytotoxic lymphocytes, that can affect the progression of a number of diseases, such as cancer, viral infections, autoimmune diseases. The distribution of *MICA* alleles in different ethnic groups varies considerably. The analysis of *MICA* polymorphism in a current ethnos is necessary for revealing the relationships between certain *MICA* alleles and different diseases. Goal. This work is aimed at studying of the distribution of *MICA* alleles in Russian population. Materials and methods. Polymorphism of *MICA* was analyzed according to the procedure proposed by Yizhou Zoe and Peter Stastny. The procedure included: 1) isolation of genomic DNA from whole blood; 2) PCR for amplification of a fragment of the *MICA* gene; 3) sequencing of the resulting PCR fragments. Analysis of the results of sequencing was carried out using the programs Vector NTI and Chromas Lite. Results. The genotype of the *MICA* alleles of 119 donors has been determined. Of the 87 *MICA* alleles described in the literature, 15 were found among the samples studied. The frequencies of *MICA* alleles were the following: \*002 – 19.3%, \*004 – 6.7%, \*007 – 3.0%, \*008 – 35.7%, \*009 – 10.1%, \*010 – 5.0%, \*011 – 3.8%, \*012 – 2.1%, \*016 – 2.5%, \*017 – 3.4% \*018 – 5.5%, \*019 – 0.4%, \*027 – 1.3%, \*053 – 0.8%, \*068 – 0.4%. The distribution of *MICA* alleles in Russia was found to be similar to that of European countries. When comparing literary data for different countries of the world, it was found that the differences in the distribution of *MICA* alleles are expressed mainly between races, and not nations. Conclusions. In this paper, the distribution of *MICA* alleles in Russian population has been analyzed. It turned out to be very similar to those of other European countries and has a number of significant differences from the ethnoses of the Mongoloid race (Japan, China, Korea). The analysis of the distribution of *MICA* alleles in the Russian population may be useful for identifying the predisposition of individuals to certain diseases.

*Keywords:* МНС, *MICA*, *NKG2D*, genotyping, sequencing, population analysis

Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант № 16-04-01867.

### Введение

Ген *MICA* (Major Histocompatibility Complex class I chain-related gene A) расположен в локусе главного комплекса гистосовместимости в хромосоме 6. Этот ген кодирует трансмембранный белок *MICA*, который служит лигандом для рецептора *NKG2D*, представленного на по-

верхности лимфоцитов-киллеров (NK-клеток, CD8<sup>+</sup>T-лимфоцитов,  $\gamma\delta$ T-лимфоцитов и CD8<sup>+</sup>NKT-клеток). В норме белок *MICA* отсутствует на поверхности клеток, однако под действием ряда факторов, таких как радиация, УФ-излучение, гипоксия, тепловой шок, вирусная инфекция, наблюдается индукция его поверхностной экспрессии [4]. То же происходит при опухолевой трансформации клетки [1]. Экспрессирующие *MICA* клетки могут быть распознаны цитотокси-

ческими лимфоцитами и элиминированы. Таким образом происходит уничтожение потенциально опасных для организма клеток, в частности опухолевых и инфицированных вирусами.

Белок *MICA* структурно схож с белками HLA класса I: он состоит из трех внеклеточных доменов ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  и  $\alpha 3$ ), трансмембранного и цитозольного доменов. Однако, в отличие от последних, *MICA* не связывает  $\beta 2$ -микроглобулин, не способен презентировать антигенный пептид и в нем отсутствуют сайты связывания с CD8. Домены  $\alpha 1$  и  $\alpha 2$  формируют сайт связывания с рецептором NKG2D цитотоксических лимфоцитов. К посттрансляционным модификациям белка относятся N-гликозилирование внеклеточных доменов (описано 7 или 8 сайтов у разных аллелей) и S-ацилирование цитозольного фрагмента, что влияет на закрепление белка в определенных микродоменах мембраны клетки [4].

Ген *MICA* является высокополиморфным: на данный момент описано 87 аллелей. Свойства белковых продуктов различных аллелей существенно различаются, при этом оба имеющих в генотипе аллеля экспрессируются кодоминантно [7]. Основными параметрами, по которым наблюдаются различия между аллельными вариантами белка *MICA*, являются: аффинность к NKG2D, третичная структура внеклеточной части *MICA*, количество сайтов N-гликозилирования, уровень поверхностной экспрессии, способ закрепления в мембране и форма, в которой происходит высвобождение растворимых форм этих белков во внеклеточное пространство. Каждый из этих параметров оказывает существенное влияние на способность лимфоцитов-киллеров лизировать экспрессирующие *MICA* клетки [1, 4].

К настоящему времени в большинстве развитых стран проведены исследования распределения аллелей *MICA* в различных этносах. Эти работы позволили выявить взаимосвязи между строением аллельных продуктов гена *MICA* и некоторыми заболеваниями. В настоящем исследовании впервые изучено распределение аллелей *MICA* в российской популяции и проведено сравнение с имеющимися данными по другим странам.

## Материалы и методы

Исследование проводили на образцах крови здоровых доноров, давших информированное согласие на использование их крови в научных исследованиях. Генотипирование проводили путем секвенирования фрагмента гена *MICA*, содержа-

щего экзоны 2-5, по методу, предложенному Zou и Stastny [11] с некоторыми модификациями. Вкратце. 1. Геномную ДНК выделяли из образцов крови с помощью набора GeneJet Genomic DNA Purification kit (кат.# K0722, Thermo Scientific, США) согласно инструкциям производителя. 2. Проводили ПЦР с помощью описанных в статье праймеров *MICA*6823-F и *MICA*9023-R с целью амплифицировать фрагмент, содержащий экзоны 2-5 гена *MICA*. Для амплификации использовали высокоточные полимеразы Phusion Flash и Phusion Hot Start II (кат.# F548 и #F549 соответственно; ThermoFisher Scientific, США). Вторую из них использовали для дополнительной проверки гомозиготных образцов. 3. Результаты ПЦР и количество полученного ПЦР-продукта оценивали методом электрофореза в 1% агарозном геле путем сравнения с маркером, содержащим известное количество ДНК определенного размера. Количественное сравнение проводили с помощью программы ImageLab, Bio-Rad, США. 4. Очистку и секвенирование ПЦР-фрагментов осуществляли в компании Евроген (Москва). Для секвенирования использовали набор праймеров, предложенный в статье Zou и Stastny [11]. 5. Анализ сиквенсов проводили с помощью программ VectorNTI (Life Technologies, ThermoFisher Scientific, США) и ChromasLite (Technelysium Pty Ltd, Австралия); анализировали отличия полученных сиквенсов от консенсусной последовательности аллеля *MICA*\*001. Для типирования использовали данные о последовательностях кДНК аллелей *MICA*, взятые со следующего сайта: [https://raw.githubusercontent.com/ANHIG/IMGTHLA/Latest/alignments/MICA\\_nuc.txt](https://raw.githubusercontent.com/ANHIG/IMGTHLA/Latest/alignments/MICA_nuc.txt).

## Результаты и обсуждение

Всего было проанализировано 119 индивидов (53 женщины и 66 мужчин). Частоты аллелей были рассчитаны по формуле: количество обнаруженных аллелей/2n, где n – число образцов (119). Распределение частот аллелей *MICA* не противоречило закону Харди–Вайнберга ( $p = 0,18$ ); анализ был проведен согласно методу, предложенному Guo и Thompson [5]. Полученные результаты приведены в таблице 1.

В российской популяции выявлено 15 аллелей *MICA* из описанных 87. В других работах количество обнаруженных аллелей также значительно ниже общего числа известных аллелей *MICA*. Этот результат можно объяснить следующими причинами. 1. Некоторые аллели, первоначально включенные в базу данных, не были подтверждены дальнейшими исследованиями (например,

ТАБЛИЦА 1. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ АЛЛЕЛЕЙ MICA В РОССИЙСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ И НЕКОТОРЫХ ЗАРУБЕЖНЫХ СТРАНАХ  
TABLE 1. DISTRIBUTION OF MICA ALLELES IN RUSSIAN POPULATION AND CERTAIN FOREIGN COUNTRIES

Аллель Allele	Россия Russia (n = 119)	Германия Germany (n = 110)	Австрия Austria (n = 320)	Словакия Slovakia (n = 124)	Япония Japan (n = 114)*	Корея Korea (n = 199)**	Северный Китай North China (n = 104)***
*001	–	0,5	0,9	–	–	–	–
*002	19,3	13,2	10,9	16,5	12,5	17,8	12,0
*004	6,7	5,5	6,4	7,3	11,1	12,3	4,8
*006	–	0,5	0,3	0,8	–	–	–
*007	3,0	3,2	4,5	6,9	0,9	3,3	1,5
*008	35,7	40,5	43,1	37,1	25,2	10,8	23,6
*009	10,1	10,9	10,9	11,3	18,4	10,6	12,5
*010	5,0	5,5	5,9	2,8	12,5	18,3	18,8
*011	3,8	3,2	2,1	2,0	–	–	0,5
*012	2,1	4,5	1,6	1,2	10,9	11,1	1,0
*016	2,5	1,4	3,1	2,0	–	–	1,0
*017	3,4	2,7	3,3	2,0	н/о n/d	–	1,9
*018	5,5	2,7	4,6	6,9	н/о n/d	–	0,5
*019	0,4	1,8	0,3	2,0	н/о n/d	–	3,9
*027	1,3	1,8	1,5	0,8	н/о n/d	13,6	5,3
*029	–	–	0,2	–	н/о n/d	–	–
*033	–	–	–	–	н/о n/d	–	0,5
*045	–	–	–	–	н/о n/d	–	8,2
*051	–	2,3	–	–	н/о n/d	–	–
*053	0,8	–	–	–	н/о n/d	–	–
*057	–	–	–	0,4	н/о n/d	н/о n/d	–
*067	–	–	0,2	–	н/о n/d	н/о n/d	–
*068	0,4	–	0,2	–	н/о n/d	н/о n/d	–
Ref.		[3]	[10]	[2]	[6]	[8]	[9]

Примечание. Частоты аллелей указаны в процентах. Во втором столбце представлены данные, полученные в рамках данной работы. «н/о» – аллель не был описан на момент исследования; \* – в Японии часть аллелей (8,5%) не удалось определить; \*\* и \*\*\* – у некоторых доноров была обнаружена делеция гена MICA, соответственно, 2,3% в Корее и 3,9% в Северном Китае.

Note. Alleles frequencies are presented in percents. The results of the current work are presented in the second column. “n/d”, this allele had not been described at the moment of work publication; \*, in Japan a part of alleles (8.5%) had not been discriminated; \*\* and \*\*\*, in some donors a deletion of MICA gene has been detected: 2.3% in Korea and 3.9% in North China, respectively.

аллели 005, 013, 014). 2. Большинство методов генотипирования MICA имеют ограничения, не позволяющие различать определенные аллели. Так, используемый нами метод [11] не позволяет различать пары аллелей \*009 и \*049, \*010 и \*069. 3. Многие аллели встречаются крайне редко, что можно оценить, сравнивая полученные результаты с данными по другим популяциям (табл. 1).

Наиболее часто встречающимися аллелями явились \*008 (35,7%), \*002 (19,3%) и \*009 (10,1%), что характерно для европейских стран и заметно отличается от восточных стран (Китай, Корея, Япония). По всей видимости, основные различия в распределениях частот аллелей MICA выявляют-

ся, скорее, на уровне рас, чем наций. По африканскому континенту на данный момент информации мало; полноценных исследований распределения аллелей MICA там пока не проведено.

Таким образом, нами впервые было выявлено распределение аллелей MICA в российской популяции. Обнаружено высокое сходство в распределении аллелей среди европейских стран, в то время как народы монголоидной расы демонстрируют ряд существенных отличий. Полученные данные позволят проводить исследования роли тех или иных аллелей MICA в опухолевых заболеваниях и патологиях, вызванных вирусными инфекциями.

## Список литературы / References

1. Chen D., Gyllensten U. MICA polymorphism: biology and importance in cancer. *Carcinogenesis*, 2014, Vol. 35, no. 12, pp. 2633-2642.
2. Ďurmanová V., Tirpakova J., Stuchlikova M., Shawkatova I., Kuba D., Sapak M., Buc M. Characterization of MICA gene polymorphism of HLA complex in the Slovak population. *Ann. Hum. Biol.*, 2011, Vol. 38, no. 5, pp. 570-576.
3. Fürst D., Solgi G., Recker K., Mytilineos D., Schrezenmeier H., Mytilineos J. Sequence-based typing of major histocompatibility complex class I chain-related gene A alleles by use of exons 2-5 information. *Tissue Antigens*, 2011, Vol. 77, no. 3, pp. 201-205.
4. González S., Groh V., Spies T. Immunobiology of human NKG2D and its ligands. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2006, Vol. 298, pp. 121-138.
5. Guo S.W., Thompson E.A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, 1992, Vol. 48, no. 2, pp. 361-372.
6. Komatsu-Wakui M., Tokunaga K., Ishikawa Y., Kashiwase K., Moriyama S., Tsuchiya N., Ando H., Shiina T., Geraghty D.E., Inoko H., Juji T. MIC-A polymorphism in Japanese and a MIC-A-MIC-B null haplotype. *Immunogenetics*, 1999, Vol. 49, no. 7-8, pp. 620-628.
7. Molinero L.L., Marcos C.Y., Mirbaha F., Fainboim L., Stastny P., Zwirner N.W. Codominant expression of the polymorphic MICA alloantigens encoded by genes in the HLA region. *Eur. J. Immunogenet. Off. J. Br. Soc. Histocompat. Immunogenet.*, 2002, Vol. 29, no. 4, pp. 315-319.
8. Pyo C.W., Hur S.S., Kim Y.K., Choi H.B., Kim T.Y., Kim T.G. Distribution of MICA alleles and haplotypes associated with HLA in the Korean population. *Hum. Immunol.*, 2003, Vol. 64, no. 3, pp. 378-384.
9. Tian W., Cai J.H., Wang F., Li L.X. MICA polymorphism in a northern Chinese Han population: the identification of a new MICA allele, MICA\*059. *Hum. Immunol.*, 2010, Vol. 71, no. 4, pp. 423-427.
10. Wenda S., Faé I., Sanchez-Mazas A., Nunes J.M., Mayr W.R., Fischer G.F. The distribution of MICA alleles in an Austrian population: Evidence for increasing polymorphism. *Hum. Immunol.*, 2013, Vol. 74, no. 10, pp. 1295-1299.
11. Zou Y., Stastny P. High resolution MICA genotyping by sequence-based typing (SBT). *Methods Mol. Biol.*, 2012, Vol. 882, pp. 183-195.

### Авторы:

**Каневский Л.М.** — к.б.н., научный сотрудник ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

**Гречихина М.В.** — младший научный сотрудник ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

### Authors:

**Kanevskiy L.M.**, PhD (Biology), Research Associate, Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

**Grechikhina M.V.**, Junior Research Associate, Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

**Кузьмина Е.Г.** — к.б.н., доцент, заведующая лабораторией клинической иммунологии, Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Научный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Россия

**Мушкарина Т.Ю.** — научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии, Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Научный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Россия

**Спелков А.А.** — студент ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

**Стрельцова М.А.** — младший научный сотрудник ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

**Коваленко Е.И.** — к.б.н., старший научный сотрудник ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

**Kuzmina E.G.**, PhD (Biology), Associate Professor, Head, Clinical Immunology Laboratory, A. Tsyb Medical Radiological Research Center — Branch of National Medical Research Radiological Center, Obninsk, Russian Federation

**Mushkarina T.Yu.**, Research Associate, Clinical Immunology Laboratory, A. Tsyb Medical Radiological Research Center — Branch of National Medical Research Radiological Center, Obninsk, Russian Federation

**Spelkov A.A.**, Student, Shemyakin—Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

**Streltsova M.A.**, Junior Research Associate, Shemyakin—Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

**Kovalenko E.I.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Shemyakin—Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

---

Поступила 26.09.2018

Отправлена на доработку 17.10.2018

Принята к печати 29.10.2018

Received 26.09.2018

Revision received 17.10.2018

Accepted 29.10.2018