

# ГЕНОМИКА- МЕДИЦИНЕ



# ГЕНОМИКА- МЕДИЦИНЕ

Под ред. акад. РАМН В.И. Иванова  
и акад. РАН Л.Л. Киселева



МОСКВА  
ИКЦ «АКАДЕМКНИГА»  
2005

УДК 544  
ББК 24.54  
Г34

Геномика – медицине. Научное издание/ Под ред. академика РАМН В.И. Иванова и академика РАН Л.Л. Киселева. – М.: ИКЦ «Академкнига», 2005. – 392 с.: ил.

ISBN 5-94628-212-3

Книга написана известными российскими учеными, специалистами в области медицинской генетики, молекулярной биологии и медицины. Она посвящена последним достижениям молекулярной генетики и геномики, используемых в медицине и здравоохранении. Обсуждаются последние данные по диагностике многих наследственных и социально значимых заболеваний, а также молекулярный механизм их возникновения.

Для врачей, биологов, студентов и аспирантов соответствующих вузов; в качестве пособия к курсам по генетике, геномике, наследственным болезням, онкологии, эндокринологии, кардиологии и др.

*Научное издание*

## **ГЕНОМИКА – МЕДИЦИНЕ**

Зав. редакцией *М.Р. Погосбекова*

Редакторы *Н.М. Александрова, Т.И. Кощеева*

Художник *А.С. Скороход*

Дизайнер обложки *О.Ю. Ильина*

Дизайнеры *И.М. Кадченко, Л.А. Кашурникова, О.Ю. Ильина*

Компьютерный дизайн и верстка *С.Н. Лаврентьева*

ИД № 4284 от 15.03.2001

Подписано в печать 28.01.2005. Формат 70×100<sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Гарнитура NewtonС.

Печать офсетная. Печ. л. 24,5 + 0,5 цв. вклейка. Тираж 3000 экз. Тип. зак. 2014.

Международная академическая  
издательская компания «Наука/Интерпериодика»

Издательско-книготорговый центр «Академкнига»

117997, Москва, Профсоюзная ул., 90

*По вопросам поставок обращаться в отдел реализации ИКЦ «Академкнига»*

*Тел./факс: (095) 334-73-18*

*e-mail: bookreal@maik.ru, web-site: <http://www.akademkniga.com>*

*Книги ИКЦ «Академкнига» можно приобрести через агентство «Почта-Сервис».*

*Заказы направлять по адресу: 125413 г. Москва, А/Я 5.*

*тел.: 453-30-60, 450-60-13, факс: 453-60-13,*

*e-mail: [agentsvops@list.ru](mailto:agentsvops@list.ru)*

*Агентство «Почта-Сервис».*

Отпечатано с готовых диапозитивов в  
ОАО «Ивановская областная типография»

153008, г. Иваново, ул. Типографская, 6

E-mail: 091018@adminet.ivanovo.ru

ISBN 5-94628-212-3

© Иванов В.И., Киселев Л.Л., 2005

© ИКЦ «Академкнига», 2005

# Геном человека и молекулярная медицина

## Краткое введение

*В.С. Баранов, Л.Л. Киселев*

Жизнь любого живого организма — от бактерии до человека целиком зависит от множества клеточных белков, но их структура, многообразие, сохранение неизменными в ряду поколений и эволюция определяются геномом.

**Геном** — это наследственный аппарат клетки, содержащий весь объем информации, необходимой для развития организма, его существования в определенных условиях среды, эволюции и передачи всех наследственных свойств в ряду поколений. Наука, изучающая молекулярную структуру геномов живых организмов, получила название **геномики**.

Основу генома человека составляет молекула ДНК — знаменитая «нить жизни», двуспиральная структура которой была гениально предсказана и обоснована Джеймсом Уотсоном и Фрэнсисом Криком [Watson, Crick, 1953]. Молекула ДНК состоит из четырех нуклеотидов, каждый из которых имеет в качестве основания пурин (аденин или гуанин) или пиримидин (тимин или цитозин). Основания связаны между собой через дезоксирибозу и остатки фосфорной кислоты в длинную полимерную цепь. При формировании двойной спирали обе нити ДНК соединяются между собой посредством водородных связей между нуклеотидами, причем так, что аденин всегда связан водородными связями с тимином, а гуанин — с цитозином (АТ и ГЦ пары, соответственно). В чередовании пар оснований в молекуле ДНК и заложен генетический код для каждой из 20 природных аминокислот, из которых построены все белки организма. Этот генетический код — трехбуквенный, т.е. каждой аминокислоте в белке соответствуют свои три нуклеотида, свой триплет в ДНК. Общая длина молекул ДНК в каждой клетке человека составляет около 2 м, а число нуклеотидов, составляющих эту уникальную «нить жизни» — около 3,3 млрд пар. Фрагменты этой нити и составляют то, что называют **генами**, т.е. кодирующими участками генома, определяющими структуру всех белков и рибонуклеиновых кислот (РНК) организма. Получение точных данных о первичной структуре генома человека, т.е. о последовательности его нуклеотидов, равно как и о том, сколько генов у человека, как они организованы в хромосомах, давно привлекало и привлекает пристальное внимание биологов, а в последние десятилетия также физиков, химиков и математиков.

В 1986 г. Министерством энергетики США были выделены крупные денежные средства на изучение генома человека. У истоков этих исследований стоял известный биофизик и биохимик Чарльз Кантор. Позже активным инициатором и пропагандистом программы «Геном человека» стал знаменитый Джеймс Уотсон, нобелевский лауреат, а главным распорядителем финансов — Национальный институт здоровья США, в составе которого в 1995 г. появился Национальный институт исследования генома человека, возглавляемый Фрэнсисом Коллинзом.



В этом же году он стал и руководителем международной программы «Геном человека», к которой присоединились ведущие молекулярные лаборатории Великобритании, Франции, Германии, Японии и России. Решающая роль в становлении и развитии одноименной отечественной программы принадлежит выдающемуся ученому, академику Александру Александровичу Баву (1904–1994).

Исходной задачей программы «Геном человека», сформулированной еще Ч. Кантором, было создание генетической и физической карт генома человека, которые должны были стать основой *расшифровки точной последовательности четырех нуклеотидов всех гигантских молекул ДНК, образующих геном*, для чего были разработаны специальные методы секвенирования ДНК (от английского sequence — последовательность). Первоначально программа была запланирована на 15 лет и ее стоимость оценивалась в 3 млрд долларов США: цена одного шага, т.е. установление положения одного нуклеотида в цепи ДНК, составляла тогда около одного доллара. Однако серьезные технические и методические усовершенствования позволили автоматизировать процесс секвенирования, сделать его более эффективным, быстрым и экономичным. В результате, уже в июне 2000 г. было объявлено о завершении первого этапа программы — создании «чернового варианта» генома человека. Уместно отметить, что честь этого эпохального достижения мировой науки наряду с международной программой «Геном человека», которая включала более 100 центров по секвенированию ДНК и около 1100 ученых разных стран, принадлежит и частной, бурно развивающейся фирме Celera Genomics, организовавшей в 1998 г. Институт геномных исследований (TIGR) под руководством известного ученого Крэйга Вентера. Основные итоги расшифровки «чернового варианта» генома человека были опубликованы этими центрами в февральских номерах ведущих научных журналов «Nature» (Feb.15, 2001) и «Science» (Feb.16, 2001).

Приведенные в них результаты находятся в открытом доступе: [www.ornl.gov/hgmis/project/journals/journals.html](http://www.ornl.gov/hgmis/project/journals/journals.html) (табл. 1, № 13). Они во многом совпадают, хотя имеются некоторые отличия. Отметим только, что полностью секвенирование генома человека в основном завершено к апрелю 2003 г. — 50-летию юбилею открытия двойной спирали ДНК Дж. Уотсоном и Фр. Криком. Информация по всем исследованиям по программе «Геном человека» и дочерним направлениям науки, непосредственно связанным с этой программой, широко представлена в Интернете (табл. 1).

**«Черновой вариант» генома человека.** Основные характеристики «чернового варианта» генома суммированы в табл. 2. Прежде всего необходимо отметить, что секвенирован не весь геном, а только около 90% нуклеотидной последовательности ДНК эухроматических (слабо окрашивающихся красителем Гимза или флуорохромами) районов хромосом. Размер эухроматической части генома составляет около 2,9 млрд п.н. Технически наиболее сложными для секвенирования оказались сателлитная ДНК теломерных и околоцентромерных участков хромосом, сильно спирализованные области интеркалярного (внутрихромосомного) гетерохроматина (районы, ярко окрашивающиеся красителем Гимза или флуорохромами), а также небольшие интерстициальные фрагменты, так называемые *эпы* (gap). Эти участки генома пока остаются нерасшифрованными. Кроме того, к 2001 г. были секвенированы геномы лишь нескольких человек. Допустимая погрешность секвенирования в этом случае составляет одну ошибку на  $10^4$  пар ну-

## Основные адреса Интернета по программе «Геном человека» (ПГЧ)

1. Доступ к общей информации	<a href="http://www.ornl.gov/hgmis">http://www.ornl.gov/hgmis</a>
2. Национальный институт по исследованию генома человека	<a href="http://www.nhgri.nih.gov">www.nhgri.nih.gov</a>
3. Нац. центр. биотехн. информ. (NCBI) (ОМIM)	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim</a>
4. Геномика – наука о жизни	<a href="http://doegenomestolife.org">doegenomestolife.org</a>
5. ПГЧ и экология	<a href="http://www.niehs.nih.gov/envgenom/home.htm">www.niehs.nih.gov/envgenom/home.htm</a>
6. Анатомия генома человека и рак	<a href="http://www.ncbi.nlm.gov/ncicgap/">www.ncbi.nlm.gov/ncicgap/</a>
7. SNP-консорциум	<a href="http://snp.cshl.org">snp.cshl.org</a>
8. Медицина и новая генетика	<a href="http://www.ornl.gov/medicine/medicine.html">www.ornl.gov/medicine/medicine.html</a>
9. Геном и предиктивная медицина	<a href="http://www2.cdc.gov/nceh/genetics">http://www2.cdc.gov/nceh/genetics</a>
10. Геном, медицина и общество (справочное издание)	<a href="http://www.ornl.gov/hgmis/launchpad/">www.ornl.gov/hgmis/launchpad/</a>
11. Этические, юридические и социальные аспекты ПГЧ	<a href="http://www.ornl.gov/hgmis/elsi/elsi.html">www.ornl.gov/hgmis/elsi/elsi.html</a>
12. «Черновой вариант» генома	<a href="http://www.ornl.gov/hgmis/project/journals/journals.html">www.ornl.gov/hgmis/project/journals/journals.html</a>
13. ПГЧ для преподавателей	<a href="http://www.ornl.gov/hgmis/education/education.html">www.ornl.gov/hgmis/education/education.html</a>
14. ПГЧ для студентов	<a href="http://www.ornl.gov/hgmis/education/students.html">www.ornl.gov/hgmis/education/students.html</a>

клеотидов. В 2000 г. только хромосомы 21 и 22 были просеквенированы двумя большими международными группами с более высокой точностью.

Как следует из приведенных данных (табл. 2), только 1,2% всей ДНК кодирует структуру молекул белков, тогда как более 80% ДНК представлено повторяющимися нуклеотидными последовательностями различной протяженности, более половины которых составляет так называемая «паразитическая» («эгоистическая») ДНК, функции которой остаются неизвестными. В конце 2002 г. при сравнительном компьютерном анализе геномов человека и лабораторной мыши сделано поразительное наблюдение, позволившее предположить, что именно в повторяющихся участках геномной ДНК (в том числе и в «эгоистической» ДНК) закодирована информация, обеспечивающая всю программу индивидуального развития, т.е. всю партитуру «симфонии жизни», проигрываемой на молекуле ДНК.

Другая особенность заключается в том, что структура геномов людей разных национальностей, разных расовых и этнических групп на 99,9% идентична. Межиндивидуальная вариабельность даже при секвенировании генов представителей белой, желтой и черной рас не превысила 0,1% и была обусловлена, главным образом, *однонуклеотидными заменами* – SNP (single nucleotide polymorphisms). Такие замены очень многочисленны, они встречаются через каждые 1–2 т.п.н. и их общее число оценивается в 3,2 млн (табл. 2). Предполагают, что половина всех SNP (примерно 1,5 млн) приходится на *смысловую (экспрессирующуюся) часть генома*. Именно эти замены, как оказалось, особенно важны для молекулярной диагностики наследственных болезней (см. гл. 2) и играют основную роль в генетическом полиморфизме человека (см. гл. 3).

Согласно последним данным (табл. 1, № 3, 5, 11), уже секвенированы геномы семи человек (всего около 22,1 млрд п.н.). При этом 30% генома человека секвенировано 8–10 раз с точностью 99,99% и допустимой частотой ошибки – одна на  $10^4$  п.н.

Таблица 2

**Основные характеристики первого («чернового») варианта генома человека  
[Nature, 15 February 2001, Vol. 409, No. 6822]**

<b>Предварительные оценки</b>	
Общая длина молекулы ДНК	1,5–1,7 м
Число нуклеотидов	$3,3 \times 10^9$
<b>Общая характеристика</b>	
Просеквенировано (установлена первичная последовательность нуклеотидов)	90%
Допустимая частота ошибок	$1 \times 10^4$
Частота ошибок секвенирования хромосом 21 и 22	$1 \times 10^6$
Несеквенировано	10%
<b>Общая структура ДНК генома</b>	
Повторяющиеся последовательности	45–50%
Транскрибируемая часть составляет:	
Всего	28–30%
транскрибируется в РНК	23–25%
транслируется до белков (экзонная часть генома)	5%
Кодирует синтез всех белков организма	1,2%
«Паразитическая» ДНК (LTR, SINE, LINE, Transposones)	45%
Короткие повторы (микросателлитная ДНК)	3%
Длинные геномные повторы	5%
<b>Генетический полиморфизм</b>	
Идентичность геномов разных индивидуумов	99,9%
Межиндивидуальная вариабельность	0,1%
Общее число однонуклеотидных замен (SNP)	$3,2 \times 10^6$
Число «значимых» (внутригенных) SNP	$1,5 \times 10^6$
<b>Число генов</b>	
Хромосома 21	225
Хромосома 22	525
Всего определено	
Human Genome Project	31 780
Celera Genomics	38 114
Всего идентифицировано	
Human Genome Project	22 000
Celera Genomics	26 000
Картировано на хромосомах [OMIM, 2002 December]	14 065

Важнейшим итогом создания «чернового варианта» генома стало определение общего числа генов человека (около 35 000–37 000), большая часть которых (около 22 000) уже идентифицирована и половина из них (11 000) картирована на индивидуальных хромосомах. Ежедневно обновляемую информацию о картированных генах человека можно получить в Интернете на сайте OMIM NCBI GenBank (табл. 1, № 4). Следует отметить, что к 2003 г. идентифицированы, клонированы и изучены на присутствие мутаций гены практически всех наиболее частых наследственных заболеваний.

При расшифровке первичной структуры генома человека установлены следующие его особенности:

- размер генома человека оценен в 3164,7 м.п.н.;
- средний размер одного гена около 3 т.п.н., а самого большого из известных на сегодняшний день – гена дистрофина – 2,7 м.п.н.;
- до сих пор почти ничего неизвестно о функциях почти половины всех генов человека;
- повторяющиеся последовательности генома не кодируют белки, но они важны для поддержания структуры и функции хромосом и содержащихся в них генов. Кроме того, некоторые из них могут кодировать так называемые малые, или интерферирующие РНК (RNAi);
- за последние 50 млн лет в геноме человека, в отличие от генома мыши, отмечается резкое снижение включения новых повторяющихся последовательностей;
- районы хромосом, обогащенные ГЦ-парами (светлые участки), содержат много генов;
- районы хромосом, богатые АТ-блоками (темно окрашенные участки), содержат мало генов;
- гены сосредоточены в областях генома, которые отделены друг от друга протяженными районами некодирующей ДНК;
- смысловые (структурные) гены отделены от бессмысленной «эгоистической» ДНК протяженными монотонными последовательностями из ГЦ-пар, длиной до 30 т.п.н. (так называемыми CpG-островками), которые регулируют функциональную активность генов;
- в отличие от человека, гены у других организмов более равномерно распределены вдоль хромосом;
- благодаря особенностям считывания генетической информации (транскрипции) и химическим модификациям продуктов трансляции РНК (белков), у человека во много раз больше белков, чем у дрозофилы или нематоды, т.е. с одного гена может считываться информация для синтеза нескольких белков с различными функциями;
- большинство белков человека тождественны или очень похожи на белки дрозофилы, нематоды и даже растений, но семейства белков, отвечающих за процессы раннего онтогенеза и иммунитет, у человека более многочисленны и разнообразны;
- только 94 из 1278 семейств белков, закодированных в геноме человека, свойственны лишь позвоночным;
- пока идентифицировано только около 300 генов, отличающих геном человека от генома лабораторной мыши;
- число повторов в геноме человека (50%) много больше, чем у пшеницы (11%), нематоды (7%) и мухи (3%);
- в геноме человека уже идентифицированы 1,4 млн SNP (см. выше), что очень важно для быстрого картирования новых генов (см. гл. 2) и для изучения генетической предрасположенности к частым (мультифакториальным) заболеваниям, а также для разработки основ индивидуальной (персонализированной) медицины (см. гл. 11);
- число спонтанных мутаций в сперматозоидах человека превышает таковое в яйцеклетках, что, по-видимому, отчасти связано с большим числом клеточных делений при сперматогенезе.

В конце 2002 г. появилась информация, что с высокой точностью (99,99%) завершено секвенирование еще восьми хромосом: 5, 6, 7, 14, 16, 19, 20 и Y, и программа «Геном человека» к сентябрю 2002 г. уже выполнена на 87% и полностью будет завершена к апрелю 2003 г. [Mauger, 2002].

В настоящее время ежедневно идентифицируют около 100 генов [Uhlen, 2002]. Неожиданным явилось обнаружение необычно большого числа генов на хромосоме 19 (более 1400), что превышает число генов (800), известных сегодня на самой большой хромосоме 1 [Mauger, 2002].

**Геном человека и другие направления геномики.** Выполнение первого этапа программы «Геном человека» имело огромный научный резонанс. Уже в середине 90-х г. XX в. возникли и получили стремительное развитие сравнительная геномика (I), разнообразие геномов человека (II) функциональная геномика (III), социальные, этические и правовые аспекты генома человека (IV) [Collins et al 1998; 1999; Иванов, Юдин, 1998; Киселев, 2000; Баранов и др. 2000; Баранов, 2000 а, в; Баранов и Айламазян, 2001]. Эти и другие направления, родившиеся в ходе выполнения программы «Геном человека», представлены на рис. 1.

Новые направления, особенно II и III, активно проникают во все сферы жизни человека, что позволяет уже сейчас говорить о быстро нарастающей «геномизации» человечества.

Помимо генома человека к настоящему времени секвенированы геномы многих других организмов, в том числе около 400 видов бактерий, а также дрожжей, дрозофилы, нематоды, японской рыбки *Pufo (Fugu rubripes)*, растений – травы (*Arabidopsis thaliana*) и риса. В декабре 2002 г. появилось официальное сообщение о завершении секвенирования генома мыши. На подходе расшифровка геномов крысы, кролика, свиньи, шимпанзе и других организмов. Наличие такой информации в Интернете открывает возможности для сравнительного компьютерного анализа геномов разных организмов, что важно для понимания процессов эволюции, для картирования генов человека, для создания универсальной системы классификации живых организмов, исходя из структуры их геномов. Есть основания предполагать, что компьютеризованный анализ геномов различных животных позволит создать нечто вроде Периодической системы геномов [Baranov, 1996]. Будет ли она по аналогии с известной Периодической системой химических элементов Д.И. Менделеева двухмерной или окажется многомерной, покажет будущее. Однако сама возможность создания такой биологической Периодической системы сегодня уже не представляется фантастичной [Lander, 1999]. Методами сравнительной геномики уже установлена почти полная идентичность геномов человека и шимпанзе, по-новому трактуются вопросы эволюции человека.

Геномы всех людей, за исключением однойцевых близнецов, различны. Выявленные популяционные, этнические и, главное, индивидуальные различия геномов как в их смысловой части (экзоны), так и в их некодирующих нуклеотидных последовательностях (межгенные промежутки, интроны и пр.), обусловлены различными мутациями, приводящими к генетическому полиморфизму, являющемуся предметом пристального изучения быстро набирающей силу программы «Генетическое разнообразие человека».

Сравнительный анализ геномов представителей разных рас и этнических групп доказал не только глубокое генетическое родство всех людей (сходство геномов – 99,9%), но и позволил получить ценную информацию о происхождении

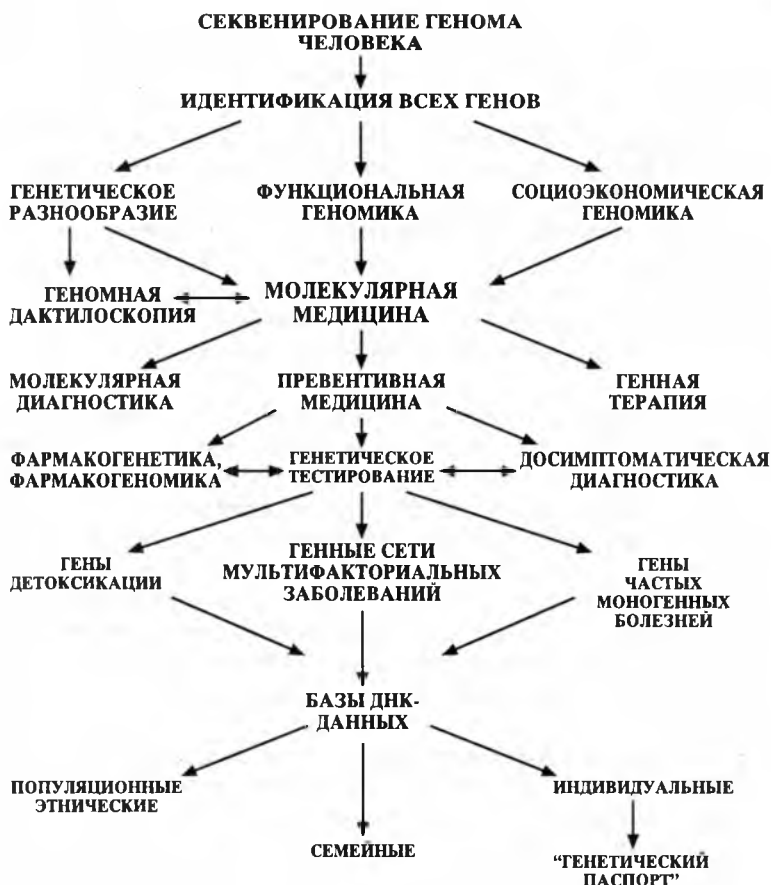


Рис. 1. Новые направления в исследовании генома человека

человека, путях его расселения по планете, механизмах этногенеза и пр. Решение многих проблем геногеографии, происхождения человека, эволюции генома в филогенезе и этногенезе – вот круг фундаментальных проблем, стоящих перед этим быстро развивающимся направлением [Гинтер и др., 1997; Хуснутдинова, 2000; Лимборская и др., 2002].

В то время как основные задачи геномики ограничиваются исследованиями структуры генома, идентификацией генов, исследованиями генных мутаций и полиморфизмов и другими аспектами «анатомии» генома, функциональная геномика полностью посвящена проблемам работы генома. Отсюда такие новые направления геномики как *транскриптомика* (масштабный анализ мРНК для выяснения того, когда, где и при каких условиях транскрибируются разные гены), *протеомика* (исследование синтеза и функций наборов белков в разных клетках на различных стадиях развития), *структурная геномика* (исследование трехмерной структуры белков каждого семейства для более полного понимания их функций и получения новых лекарств).

По мере стремительного увеличения числа новых генов, все более очевидным становится недостаток имеющихся данных об их функциях и, прежде всего, о функциональной значимости тех белков, которые они кодируют. Из более 30 тыс. генов, уже идентифицированных на физической карте генома человека, на сегодняшний день изучены в функциональном отношении не более 10–11 тыс. (см. табл. 1, № 8, 12). Каковы функции остальных 20 тыс. генов, остается неизвестным и составляет основную стратегическую задачу исследований в программе «Функциональная геномика». Нет сомнения в том, что именно изучение структуры, функции и взаимодействия белков станет основой функциональной геномики, которая получила название «*протеомика*» [Киселев, 2000]. Методы направленного мутагенеза эмбриональных стволовых клеток с целью получения лабораторных животных (мышей) — биологических моделей наследственных болезней [Горбунова, Баранов, 1997], создание банков кДНК различных тканей и органов на разных стадиях онтогенеза; разработка методов изучения функций участков ДНК, не кодирующих белки; развитие новых технологий по сравнительному анализу экспрессии многих тысяч генов — вот уже существующие подходы в решении проблем функциональной геномики-протеомики [Wright et al., 2001]. Предполагают, что создание полного геномного портрета человека позволит идентифицировать 200–300 тыс. белков. Выяснить их появление в онтогенезе, исследовать «экспрессионный профиль» сотен и тысяч генов на микропланшетах для мониторинга экспрессионного статуса клеток и тканей в норме и при различных заболеваниях — центральная задача функциональной геномики в уже наступившую геномную эру [Киселев, 2000]. Решение ее непосредственно связано с проблемами молекулярной медицины.

**Этические, правовые и социальные аспекты генома человека.** По мере все более полной «геномизации» жизни человека, т.е. проникновения геномики не только во все разделы медицины, но и далеко за ее пределы, в том числе в социальные сферы, нарастающей заинтересованности всех слоев мирового сообщества в достижениях генетики [Collins, 1999], все более очевидным для ученых, правительств и просто образованных людей становится необходимость решения многочисленных этических, юридических, правовых и социальных проблем, порождаемых успехами в изучении генома человека и понимании его функций [Иванов, Юдин, 1998; см. гл. 10]. Ряд этических, правовых и социальных программ, направленных на изучение проблем адаптации человека и общества в целом к восприятию достижений генетики, быстро развиваются при финансовой поддержке тех же комитетов, институтов и организаций, которые финансируют и программу «Геном человека» [Collins, 1999].

**Геном человека и молекулярная медицина.** Одним из главных итогов изучения генома человека стало появление и быстрое развитие качественно нового раздела медицинской науки — *молекулярной медицины* [Collins, McKusick, 2001; Peltonen, McKusick, 2001]. Идентификация многих тысяч структурных и регуляторных генов, выяснение генной природы и молекулярных механизмов многих наследственных и мультифакториальных болезней, роли генетических факторов в этиологии и патогенезе различных патологических состояний, в том числе многих инфекций, доказательство генетической уникальности каждого индивидуума — вот достижения, составляющие научную основу молекулярной медицины. Нет сомнения в том, что именно ей принадлежит будущее, т.е. молекулярная медицина,



включающая генную терапию — это и есть Медицина XXI века [Баранов, 2000 а] (см. табл. 1, № 10).

Следует отметить общепризнанные достижения и быстро развивающиеся новые направления (см. рис. 1) молекулярной медицины. Главные из них:

- разработаны точные, эффективные и, в значительной степени, универсальные методы диагностики наследственных болезней (гл. 3) на любой стадии онтогенеза, в том числе и до рождения (**пренатальная диагностика**) [Пузырев, Степанов, 1997; Бочков, 2001 а, б; Баранов и др., 2002];
- разработаны молекулярные подходы к абсолютно точной идентификации личности (**геномная дактилоскопия**) [Янковский, 1996];
- заложены экспериментальные и клинические основы **генной терапии** наследственных и ненаследственных болезней [Свердлов, 1996; Баранов, 2000; Баранов и др., 2001];
- на основе данных об индивидуальном биохимическом (генетическом) фингерпринте, т.е. генетической (биохимической) уникальности каждого человека начаты исследования по **фармакогенетике** — анализу причин особенностей низкой или, наоборот, повышенной чувствительности индивидов или отдельных популяций (этносов) к действию различных лекарственных препаратов или химических веществ [Nebert, Carvan, 1997; Баранов, 2000 а, б; Constans, 2002] и по **фармакогеномике** — использованию данных геномики для разработки основ индивидуальной терапии и направленному созданию новых лекарств, специфически влияющих на отдельные звенья патологического процесса [Evans, Johnson, 2001; Altman, Klein, 2002; Constans, 2002; Root, 2002] (см. также в Интернете: табл. 1, № 4, 5);
- активно разрабатываются молекулярные основы профилактической (предиктивной) медицины — гл. 11 [Баранов и др., 2000; Баранов, Хавинсон, 2001], (см. табл. 1, № 9, 10).

Таким образом, «всеобщая геномизация», спровоцированная расшифровкой генома человека и других организмов, привела к появлению молекулярной медицины. Характерной особенностью молекулярной медицины, как медицины, основанной на данных о молекулярной структуре генома человека, является ее индивидуальный характер. Она направлена на коррекцию патологического процесса у вполне конкретного человека с учетом уникальных особенностей его конкретного генома. Ее другая важнейшая особенность — выраженная профилактическая направленность. Полные сведения о геноме могут быть получены задолго до начала заболевания. Отсюда соответствующие коррективы и профилактические мероприятия могут полностью ликвидировать или в значительной мере предупредить развитие тяжелого заболевания. Именно молекулярная медицина и ее основные направления (предиктивная медицина, генная терапия, фармакогеномика и пр.), фундамент которых составляет геном человека, и будут определять все многообразие фундаментальных и прикладных наук о человеке в этом столетии.

Подробно различные разделы молекулярной медицины, обзор достижений в этих областях, а также нерешенные проблемы с учетом специфики исследований по геному человека и, соответственно, по молекулярной медицине в России, рассмотрены в соответствующих главах данной книги.

В то время, когда настоящая книга готовилась к публикации, на книжных полках появился учебник для вузов Н.П. Бочкова «Клиническая генетика (3-е

издание, изд. дом «Геотар-Мед», М., 2004 г., 480 с.). Монография «Геномика – медицине» может служить дополнением к этому прекрасному учебнику, так как она (монография) содержит множество конкретных сведений по тем вопросам, которые в общей форме рассмотрены в учебнике Н.П. Бочкова.

Исследования отечественных ученых, описанные в монографии были выполнены в рамках целевой программы «Геном человека» и получили финансовую поддержку через Министерство промышленности и науки РФ.

## Литература

- Баранов В.С.* Молекулярная медицина – основа генной терапии // Мол. биол. 2000 а. Т. 34, № 4. С. 684–695.
- Баранов В.С.* Геном человека как научная основа профилактической медицины // Вестн. РАМН. 2000 б. Т. 10. С. 27–37.
- Баранов В.С., Айламазян Э.К.* Новые молекулярно-генетические подходы в профилактике, диагностике и лечении наследственных и мультифакториальных заболеваний // Мед. академ. журнал. 2001. Т. 1, № 3. С. 33–34.
- Баранов В.С., Баранова Е.В., Иващенко Т.Э., Асеев М.В.* Геном человека и гены «предрасположенности». Введение в предиктивную медицину. СПб.: «Интермедика». 2000. 271 с.
- Баранов В.С., Баранов А.Н., Зеленин А.В.* Современное состояние и перспективы генной терапии миодистрофии Дюшенна в мире и России // Генетика. 2001. Т. 37, № 8. С. 1046–1054.
- Баранов В.С., Кузнецова Т.В., Иващенко Т.Э., Кащеева Т.К.* Лабораторные методы в пренатальной диагностике. / В кн. «Основы пренатальной диагностики». Ред. Юдина Е.В., Медведев М.В. М.: Реальное Время, 2002. С. 122–152.
- Баранов В.С., Хавинсон В.Х.* Определение генетической предрасположенности к некоторым мультифакториальным заболеваниям. Генетический паспорт / Ред. Хавинсон В.Х. СПб.: ИКФ-«Фолиант». 2001. 48 с.
- Бочков Н.П.* Генетика человека и клиническая медицина // Вестн. РАМН. 2001 а. Т. 10. С. 5–8.
- Бочков Н.П.* Вклад генетики в медицину // Рос. Мед. Вести. 2001 б. № 4. С. 4–13.
- Гинтер Е.К.* Медико-генетическое описание населения Адыгеи. Майкоп. 1997. 223 с.
- Горбунова В.Н., Баранов В.С.* Введение в молекулярную диагностику и генотерапию наследственных заболеваний. СПб.: Специальная литература, 1997. 287 с.
- Зеленин А.В.* (ред.) Генная терапия – медицина будущего. М.: ВИНТИ РАН, 2000. 136 с.
- Иванов В.И., Юдин Б.Г.* Этико-правовые аспекты программы «Геном человека». М.: 1998. 189 с.
- Киселев Л.Л.* Геном человека и биология XXI века // Вестн. РАН. 2000. Т. 70, № 5. С. 412–424.
- Лимборская С.А., Хуснутдинова Э.К., Балановская Е.В.* Этногеномика и геногеография народов Восточной Европы. М.: Наука, 2000. 281 с.
- Пузырев В.П., Степанов В.А.* Патологическая анатомия генома человека. Новосибирск: Наука, 1997. 223 с.
- Свердлов Е.Д.* Очерки современной молекулярной генетики по курсу лекций для студентов биологического факультета МГУ. Очерк 6. Генная терапия и медицина XXI века // Мол. генет., микробиол., вирусол. 1996. № 4. С. 3–32.
- Хуснутдинова Э.К.* Молекулярная этногенетика народов Волго-Уральского региона. 1999. 237 с.

Янковский Н.К. Молекулярно-генетические методы в руках детектива, или опыт исследования останков семьи последнего российского императора // Сорос. образоват. журнал. 1996. № 2. С. 21–27.

Altman R.B., Klein T.E. Challenges for biomedical informatics and pharmacogenomics // *Ann. Rev. Toxicol. Pharmacol.* 2001. Vol. 42. P. 113–133.

Baranov V.S. In: K. Berg, V. Bulyjenkov, Y. Christen (eds) «Genetic approaches to Noncommunicable Diseases». Springer-Verlag. 1996. P. 105–112.

Collins F.S., Patrions A., Jordan E. et al. New goals for the US Human Genome Project: 1998–2003 // *Science*. 1998. Vol.282. P. 682–689.

Collins F.S. Shattuck Lecture – Medical and Societal Consequences of the Human Genome Project // *New Engl. J. Med.* 1999. Vol. 341, № 1. P. 28–37.

Collins F.S., McKusick V.A. Implication of Human Genome Project for Medical Science // *JAMA*. 2001. Vol. 285, № 5. P. 1–11.

Constans A. Making Medicine Personal // *The Scientist*. Vol. 16, № 19. P. 7–14.

Evans W.E., Johnson J.A. Pharmacogenomics: the inherited basis for individual differences in drug response // *Ann. Rev. in Genet. Human Genomics*. 2001. Vol. 2. P. 9–39.

Hamosh A., Scott A.F., Amberger J., Valle D., McKusick V.A. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) // *Hum. Mutat.* 2000. Vol. 15. P. 57–61.

Lander E.S. Array of Hope // *Nature Genet.* 1999. Vol.21 (suppl). P. 3–4.

Nebert D.W., Carvan M.J. Ecogenetics: from biology to health // *Toxicol. Indust. Health*. 1997. Vol. 13. P. 163–192.

Peltonen L., McKusick V.A. Dissecting Human Disease in the Postgenomic Era // *Genomics and Medicine*. 2002. Vol. 2. P. 3–12.

Wright F.A., Lemon W.J., Zhao W.D. et al. A draft annotation and overview of the human genome. // *Genome Biol.* 2001. Vol. 2. № 7. P. 25–47.

# Стратегия идентификации генов наследственных болезней человека

Бурное развитие молекулярных исследований генома человека, завершившееся созданием его «чернового» варианта в июне 2000 г., ознаменовалось не только расшифровкой первичной нуклеотидной последовательности почти 90% его ДНК, но и получением достаточно четкой информации об общем количестве генов у человека, которое по оценкам специалистов программы «Геном человека» и сотрудников частной фирмы Celera Genomics находится в пределах 30 000–35 000. Естественно, что идентификация новых генов и выяснение их функций составляет одну из центральных проблем постгеномной эры.

В настоящей главе суммированы современные представления об основных методических подходах к решению проблемы идентификации генов моногенных заболеваний, а также наиболее частых заболеваний мультифакториальной природы, в патогенезе которых задействованы как генетические, так и экзогенные факторы.

Более подробно с проблемой картирования генов человека, мутации которых приводят к моногенным заболеваниям и предрасполагают к мультифакториальной патологии, можно ознакомиться в обзорах [Свердлов, 1995], а также в монографиях отечественных авторов [Горбунова, Баранов, 1997; Пузырев, Степанов, 1997; Горбунова, 1999; Баранов и др., 2000; Горбунова, 2001].

## 1.1. МОНОГЕННЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

*В.С. Баранов, В.Н. Горбунова*

### Общие принципы идентификации генов

Идентификация неизвестного гена, мутации которого ответственны за то или иное наследственное заболевание, обычно включает несколько этапов. На первом этапе проводят генетическое (хромосомное) картирование гена. На втором — осуществляют молекулярное (физическое) картирование, завершающееся клонированием и секвенированием соответствующего гена, а также идентификацией мутаций, приводящих к заболеванию.

Генетические карты определяют хромосомную принадлежность и взаимное расположение различных элементов генома (генов) друг относительно друга.

При построении генетических карт применяют следующие подходы:

- анализ генетического сцепления на основе определения частот мейотической рекомбинации в информативных семьях и изучение особенностей наследования признаков, сцепленных с маркерными хромосомными перестройками или известными ДНК-маркерами разных хромосом;
- поиск специфических нуклеотидных последовательностей и продуктов их экспрессии в клеточных гибридах, содержащих лишь одну или несколько хромосом человека или их фрагменты;
- гибридизация на метафазных (прометафазных) хромосомах [Harer et al., 2001], идентификация специфической ДНК на препаратах отсортированных хромосом человека или на ДНК-клонах, приготовленных из отдельных участков и даже из индивидуальных хромосомных «бэндов».

В результате, как правило, удается привязать картируемый ген к определенной хромосоме и даже к определенному ее фрагменту, вплоть до одного «бэнда». В наиболее благоприятных случаях первый этап идентификации гена завершается картированием гена в пределах 1–2 млн пар нуклеотидов (м.п.н.), что примерно соответствует размерам одного «бэнда», видимого под микроскопом [Баранов и др., 2000].

На следующем этапе проводится более точное, физическое картирование гена внутри выявленных участков хромосом: определяют наличие в них транскрибируемых фрагментов; проводят отбор и сортировку генов-кандидатов, наконец, найдя нужный ген, его выделяют, клонируют, секвенируют и исследуют на наличие мутаций, нарушающих функцию и приводящих к тому или иному заболеванию.

Важным завершающим этапом идентификации гена, помимо его секвенирования, определения экзон-интронной структуры и физических границ, является совмещение карт, что, учитывая существенную разницу масштабов генетических, цитогенетических и молекулярных карт (табл. 3) нередко бывает достаточно сложно. Так, для установления факта сцепления на генетической карте, т.е. присутствия предполагаемого гена в пределах одной хромосомы или ее плеча, необходимо наличие уже картированного маркера на расстоянии не далее 20 сантиморганид (сМ) рекомбинационной карты. При этом 1 сМ на хромосомной карте приблизительно соответствует одному «бэнду». В свою очередь, один «бэнд» прометафазной хромосомы примерно соответствует 1 м.п.н. Если учесть, что средние размеры одного гена составляют около 100–200 т.п.н., это означает, что при физическом картировании реально определяется искомая область из 5–10 генов-кандидатов.

Алгоритм картирования неизвестных генов, представленный на рис. 2, включает следующие основные этапы [Горбунова, Баранов, 1997]:

- выяснение группы сцепления;

Таблица 3

Оценка размеров генома человека

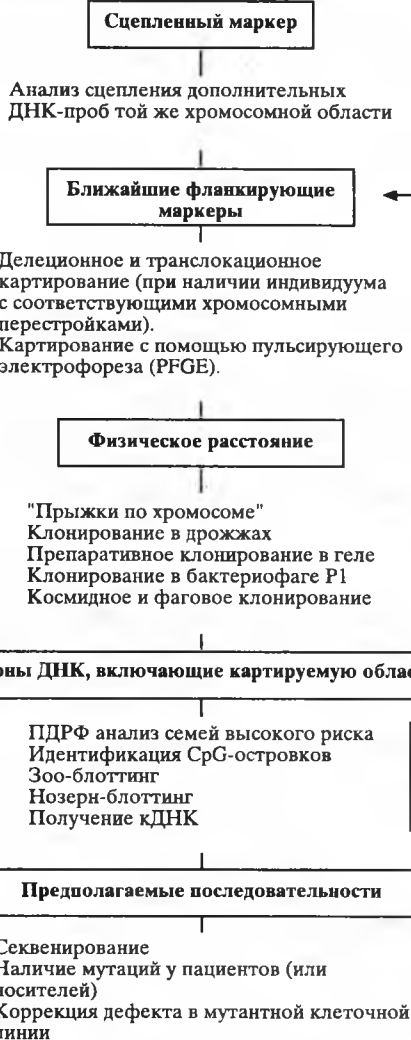
Метод оценки	Размер
Физический	$3 \times 10^9$ пар нуклеотидов (п.н.)
Генетический	3000–3500 сантиморганид (сМ)
Цитогенетический	2500–3000 Q-«бэндов» в прометафазной хромосоме

**Источники****Карта сцепления хромосом****Семьи высокого риска**

*Соматические клеточные гибриды*  
*Линии клеток с хромосомопосредованной генетической трансформацией*  
*Радиационные гибриды*

**Клонотекы**

*Зоо-блоты РНК соответствующих тканей*  
*Клонотекы кДНК*



**Рис. 2.** Схема картирования генов

- поиск ближайших фланкирующих маркеров;
- определение физической области генома, т.е. ДНК, включающей ген-мишень;
- клонирование набора фрагментов ДНК, перекрывающих исследуемую область;
- выделение ДНК-клонов, содержащих транскрибируемые ДНК, соответствующие искомому гену или его фрагменту;
- анализ специфических мРНК и клонирование кДНК;
- секвенирование и идентификация самого гена.

## Генетическое картирование

Построение карт сцепления (генетических карт) основано на изучении частот рекомбинации гомологичных хромосом в мейозе. Генетические признаки, локализованные в разных хромосомах и не сцепленные друг с другом, передаются от родителей детям независимо. Частота (вероятность) их рекомбинации ( $Q$ ) составляет 0,5 (50%). Это обусловлено случайным характером расхождения гомологичных хромосом в мейозе. Гены в одной хромосоме рекомбинируют за счет кроссинговера, т.е. обмена участками между гомологичными хромосомами. При этом порядок генов не нарушается, но в потомстве могут появиться новые комбинации родительских аллелей. Вероятность кроссинговера между двумя генами зависит от расстояния между ними. Чем ближе гены расположены друг к другу, тем сильнее они сцеплены, и тем меньше вероятность кроссинговера. Оценку сцепления между генами проводят на основании статистического анализа сегрегации признаков в семьях с большими разветвленными родословными. Чаще всего при этом используют *метод максимального правдоподобия*, т.е. подсчитывают десятичный логарифм шансов — лод-балл (logarithm of the odds), где шансы (odds) оцениваются как отношение вероятности наблюдаемой родословной при условии, что два гена сцеплены ( $0 < Q < 0,5$ ), к той же вероятности при отсутствии сцепления ( $Q = 0,5$ ). Если значение лод-балла больше +3, гены локализованы в одной хромосоме. При значениях лод-балла меньше -2, гены не сцеплены, т.е. локализованы в разных хромосомах или на разных концах одной хромосомы. Статистическую обработку родословных обычно проводят с помощью компьютерных программ LIPED, CRIMAP и LINKAGE [Terwilliger, Ott, 1994]. Как уже упоминалось, на генетических картах расстояние между генами определяется в сантиморганидах (сМ), причем 1 сМ соответствует 1% рекомбинации. Общая длина генома человека в этих единицах составляет около 3300 сМ. Такие расчеты, однако, весьма приблизительны, так как частоты рекомбинации, а, значит, и реальная длина хромосомы, соответствующая 1 сМ, могут меняться в различных частях генома. Известно, что частота кроссинговера варьирует по длине хромосомы. Количество кроссинговеров больше в дистальных (околотеломерных) отделах хромосом и значительно меньше вблизи центромеры, а также в районах локализации конститутивного гетерохроматина. Кроме того, существуют «горячие» точки рекомбинации, например, область Xq28, где число кроссинговеров особенно велико.

Таким образом, при классическом варианте генетического картирования можно получить лишь ориентировочную информацию о реальном положении гена на генетической карте и самой хромосоме.

До начала 70-х гг. XX в. построение генетических карт человека продвигалось очень медленными темпами. Первый ген человека — ген цветной слепоты, был картирован на X-хромосоме в 1911 г., а первый аутомсомный ген — только в 1968 г. К концу 1973 г. на хромосомах человека было картировано всего 64 гена. В дальнейшем скорость генетического картирования стала стремительно возрастать, главным образом, благодаря появлению многочисленных молекулярных маркеров, рассеянных по всему геному (см. ниже). Так, в 1994 г. на генетических картах человека уже было локализовано свыше 60 000 маркерных ДНК, в том числе около 5000 структурных генов. К настоящему времени число частично или полно-



стью идентифицированных генов уже превысило 20 000, а число генов, картированных на индивидуальных хромосомах, 11 000. Столь стремительный прогресс в картировании генов человека связан с появлением новых технологий в цитогенетике, в клеточной биологии и особенно молекулярной генетике.

## Гибриды соматических клеток

Техника соматической гибридизации, т.е. возможность экспериментального получения способных к размножению межвидовых клеточных гибридов, явилась одним из наиболее мощных инструментов нахождения связей между группами сцепления и цитогенетически идентифицируемыми хромосомами и даже их отдельными сегментами. Гибридные клоны получают путем искусственного слияния культивируемых соматических клеток разных видов, в частности, клеток человека и различных грызунов (китайский хомячок, мышь, крыса). Культивирование таких соматических гибридов, как оказалось, сопровождается утратой хромосом человека. Так были получены панели гибридных клеточных линий, содержащих всего одну или несколько хромосом человека или их фрагменты и полный набор хромосом другого вида. Обнаружение белков, специфических мРНК или специфических ДНК человека в таких клонах позволяет однозначно определить хромосомную принадлежность соответствующих генов. Таким способом удалось локализовать более 250 аутосомных генов человека. Картирование и идентификация генов человека с использованием техники гибридов соматических клеток не утратили своего значения и в настоящее время. Вместе с тем удельный вес этого подхода среди других современных методов идентификации генов (см. ниже), безусловно, стал значительно меньше.

## Картирование генов на хромосомах

Важным этапом поиска генов наследственных болезней является их локализация на дифференциально окрашенных метафазных и прометафазных хромосомах. В настоящее время каждая известная группа сцепления генов уже спроецирована на одну из 23 хромосом человека.

Анализ особенностей генетических карт в условиях различных хромосомных перестроек дает дополнительную информацию о точной хромосомной локализации того или иного гена. Редкие случаи ассоциации моногенных заболеваний с определенными хромосомными перестройками позволяют достаточно четко провести картирование искомого гена. Так были локализованы на хромосомах гены миодистрофии Дюшенна, нейрофиброматоза I, синдрома Прадера–Вилли, аниридии. Наличие изолированных участков гена делает возможным его локализацию методом гибридизации *in situ* непосредственно на метафазных (прометафазных) хромосомах с точностью до одного «бэнда» и даже его субъединицы. Именно таким способом к 1991 г. уже были идентифицированы на хромосомах более 2000 генов, для многих из которых тогда еще не были найдены соответствующие группы сцепления с полиморфными маркерами [Poduslo et al., 1991].

Точность цитогенетического картирования определяется степенью спирализации хромосом, типом использованной метки и разрешающей способностью микроскопа. При картировании на стандартных метафазных хромосомах и ис-

пользовании радиоактивно меченных ДНК-зондов точность картирования не превышает размеров одного крупного «бэнда» хромосомы и составляет около 5–10 м.п.н. При использовании биотиновой метки на прометафазных хромосомах точность картирования возрастает в среднем в 5–10 раз (до 1 м.п.н.), а при работе со специально приготовленными и растянутыми интерфазными хромосомами может доходить до 50 т.п.н. Тем не менее, даже при такой разрешающей способности цитогенетическое картирование дает весьма приблизительные результаты и обычно рассматривается как начальный этап физического картирования.

Локус-специфическими ДНК-зондами обычно являются клонированные в фагах или бактериях крупные фрагменты или даже полные нуклеотидные последовательности структурных генов. В последнее время, благодаря серьезным методическим усовершенствованиям, метод гибридизации *in situ* с использованием биотиновой метки с успехом применяется и для картирования кДНК генов, в том числе и фрагментов экспрессирующихся генов (так называемых *expression sequence tags* – EST) [Harer et al., 2001].

Принимая во внимание, что коллекция существующих EST, полученных из клонотек кДНК разных тканей, уже превышает 300 000 единиц, т.е. почти в 10 раз больше предполагаемого числа всех генов человека [Баранов и др., 2000], возможности для составления подробных хромосомных карт человека поистине безграничны. Отметим также, что к настоящему времени на хромосомах человека уже картировано свыше 11 000 генов (см. табл. 1, № 3).

## Идентификация генов

Собственно идентификация гена начинается с выделения фрагмента ДНК, включающего последовательность нуклеотидов искомого гена. Важную роль при этом может играть предварительная информация о положении предполагаемого гена на генетической или хромосомной картах. Наличие таких сведений существенно сужает ареал поиска. Однако поиск и идентификация гена могут проводиться и без наличия таких данных при условии точного клинического диагноза, достаточно больших разветвленных родословных и подробной информации о расположении на хромосомах удобных для молекулярного анализа ДНК-маркеров.

В качестве последних могут выступать любые полиморфные, т.е. варьирующие в популяции у разных индивидуумов, участки ДНК, так называемые *индексные маркеры*. К ним относятся полиморфные сайты рестрикции, однонуклеотидные замены и варьирующие по длине гипервариабельные мини- и микросателлитные фрагменты ДНК [Горбунова, Баранов, 1997].

Полиморфные сайты рестрикции можно идентифицировать с помощью расщепления молекулы ДНК специальными бактериальными ферментами – эндонуклеазами, рестрицирующими (разрезающими) молекулу ДНК в местах со строго определенной для каждой эндонуклеазы последовательностью нуклеотидов [Горбунова, Баранов, 1997; Горбунова, 1999]. В настоящее время известно свыше 500 различных эндонуклеаз. Для каждого фермента характерен свой сайт узнавания, состоящий из четырех и более нуклеотидов. Варьирование последовательности нуклеотидов в местах узнавания делает их устойчивыми либо, наоборот, чувствительными к действию таких ферментов и позволяет надежно идентифицировать соответствующие аллели, которые и выступают в качестве основных

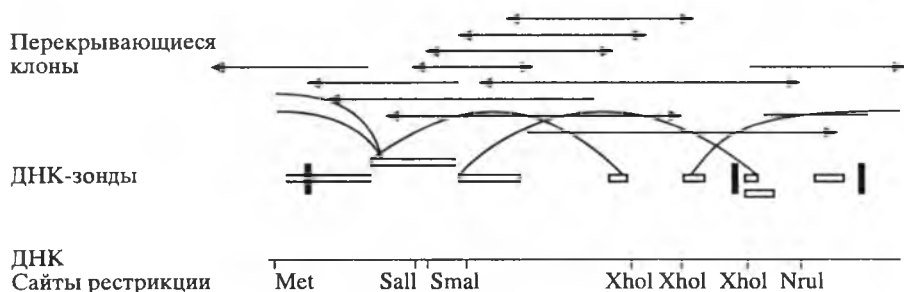
молекулярных маркеров. Этот метод находит широкое применение в молекулярной биологии. Еще более удобными молекулярными маркерами оказались высоковариабельные (по числу нуклеотидов и протяженности) *короткие тандемные повторы* (short tandem repeats – STR).

Предварительно осуществленный целенаправленный поиск полиморфных сайтов и STR с использованием образцов ДНК из коллекции CEPH (уникальной коллекции Парижского центра по изучению полиморфизма человека, где ведут перевиваемые клеточные культуры от всех членов семей, многоступенчатые родословные которых насчитывают многие десятки и даже сотни индивидуумов) [Todd et al., 1992; Weissenbach J. et al., 1992] позволил уже в 1992 г., создать геномную карту 814 индексных маркеров со средним расстоянием 5 сМ, перекрывающих практически все хромосомы человека.

Таким образом, используя молекулярные маркеры и достаточно информативную для ДНК-анализа родословную больных с той или иной наследственной патологией можно точно определить, с какой именно хромосомой сцеплено данное заболевание. Учитывая при этом, что реальное число различных молекулярных маркеров сегодня уже превышает 100 000, то после определения группы сцепления, т.е. хромосомы, где расположен данный искомый ген, аналогичным образом ареал поиска может быть уменьшен вначале до хромосомного плеча, сегмента и даже индивидуального «бэнда». Основная цель этого этапа идентификации гена моногенного заболевания может считаться достигнутой, когда точно установлены молекулярные маркеры, находящиеся с обеих сторон максимально близко к искомому гену.

На следующем этапе необходимо изолировать ДНК, лежащую между фланкирующими маркерами. Для этой цели можно воспользоваться специально разработанными клонотеками ДНК отдельных хромосом (хромосом, изолированных с помощью специального прибора) и их фрагментов в составе бактериальных (BAC), фаговых (PAC), космидных и дрожжевых (YAC) клонотек. Особенно удобны для этого специальные клонотеки ДНК, приготовленные непосредственно из материала соответствующего хромосомного «бэнда» [Рубцова и др., 2000], либо из субхромосомных фрагментов ДНК, разделенных методом гелеэлектрофореза в пульсирующем поле [Горбунова, Баранов, 1997].

Обычно размеры участка ДНК, ограниченного фланкирующими маркерами, варьируют в пределах от 100 000 до 1 000 000 п.н. Переход от таких крупных фрагментов к ДНК, соответствующей одному гену (30 000–50 000 п.н.) осуществляется с помощью молекулярного клонирования. Комплекс молекулярных методов, с помощью которых проводится поиск и изоляция гена, называется «*позиционным клонированием*» [Горбунова, 1999]. Суть метода заключается в получении набора фрагментов ДНК данной области с помощью различных рестриктаз (эндонуклеаз); создании (или отборе из уже существующих) локальных частично перекрывающихся плазмидных, космидных, дрожжевых клонотек, содержащих искомый фрагмент («насыщающее клонирование»); упорядочивании полученных клонов по всей длине выделенного участка ДНК; идентификации регуляторных и кодирующих областей генов, содержащихся в этих фрагментах. Непосредственный поиск транскрибируемой ДНК искомого гена осуществляется достаточно трудоемкими методами, получившими название «*прогулки*» и «*прыжков*» по хромосоме.



**Рис. 3.** Фрагмент схемы идентификации гена муковисцидоза методом «прогулки по хромосоме» и насыщающего клонирования [Rommens et al., 1989]

«Прогулка» по хромосоме заключается в последовательном отборе клонов, содержащих частично перекрывающиеся фрагменты ДНК из определенного района генома (рис. 3). На первом этапе проводят скрининг клонотеки с помощью маркерной ДНК, сцепленной с геном. После нахождения положительных клонов, последние уже сами служат зондами для изоляции других клонов, содержащих перекрывающиеся участки ДНК. Таким образом, каждый раз отобранный фрагмент используется в качестве скринирующего ДНК-зонда для последующего поиска. В результате получают набор клонированных фрагментов ДНК, полностью перекрывающих область поиска гена. Группа подобных клонов носит название «контигов». С помощью физического картирования инсертированной (встроенной) ДНК в разных клонах удастся точно установить степень перекрывания между соседними фрагментами и соответственно упорядочить положение клонов в «контигах». При скринировании космидных клонотек с выявлением каждого нового клона к участку ДНК, полностью перекрытому отобранными зондами, в среднем, добавляется около 20 т.п.н. Таким способом, однако, редко удастся пройти более 200–300 т.п.н. в одном направлении из-за наличия в геноме повторяющихся и трудно клонируемых ДНК.

Для преодоления этих ограничений и ускорения процесса поиска разработан метод «прыжков» по хромосоме (рис. 4). Метод позволяет изолировать фрагменты ДНК, отстоящие в геноме друг от друга на сотни тысяч нуклеотидов (длина прыжка), не изолируя при этом все промежуточные участки ДНК. Суть метода состоит в «переваривании» фрагмента геномной ДНК, в котором проводится поиск гена, с помощью особых редкощеплящих эндонуклеаз (например, *NotI*), в результате чего образуются большие фрагменты ДНК. Затем эти фрагменты переводятся в кольцевую форму путем искусственного присоединения к их концам небольшого маркерного гена. Таким образом, концы рестрикционных фрагментов сближаются. Кольцевые молекулы ДНК разрезают среднещеплящими рестриктазами и из пула относительно небольших фрагментов ДНК отбирают те, которые содержат маркерный ген, а следовательно, и окружающие его концевые участки исходных крупных фрагментов. Отобранные участки ДНК клонируют в фаговых или космидных векторах, получая клонотекку генов концевых участков. Затем в этой клонотеке проводят скрининг клонов, содержащих стартовый зонд, т.е. ДНК, гибридизующуюся со сцепленным с искомым геном ДНК-маркером. Только в этих клонах комплементарные зонду последовательности нуклеотидов соединены маркерным геном с участками ДНК, отстоящими от стартового участка поиска на длину прыжка. При



**Рис. 4.** Принципы клонирования способом «прыжков по хромосоме»

Черным цветом обозначена начальная проба, которая в окончательном фрагменте слияния соединена с другим фрагментом ДНК (белым), далеко отстоящим от исходного участка. Исходный маркер и новый сегмент в конечной слившейся последовательности соединены коротким маркерным геном (200 п.о.)

необходимости промежуточные сегменты ДНК также могут быть клонированы с использованием метода скользящего зондирования [Горбунова, Баранов, 1997].

## Критерии выявления гена-мишени

Собственно идентификация гена включает решение следующих основных задач:

1. Выявление «смысловых» нуклеотидных последовательностей внутри выделенного фрагмента ДНК.

2. Доказательство роли гена-кандидата в возникновении заболевания.

## Идентификация смысловых нуклеотидных последовательностей

Участки ДНК, являющиеся частями гена-кандидата в исследуемом фрагменте генома, могут быть выявлены на основании следующих критериев: 1) наличием специфических особенностей первичной нуклеотидной последовательности; 2) эволюционным консерватизмом; 3) гибридизацией с функционально активными продуктами генов.

1) Определение нуклеотидной последовательности выделенного фрагмента позволяет обнаружить в ряде случаев наличие типичных CpG-островков, характерных для области начала транскрипции в 5'-концах многих генов, в особенности генов «домашнего хозяйства», так называемых «открытых рамок считывания» (open reading frames — ORF) в начале смысловых нуклеотидных последовательностей многих генов; участков ДНК, характерных для сигналов сплайсинга. Важную роль в проведении таких исследований играет компьютерный анализ исследуемых последовательностей нуклеотидов, их сравнение с другими уже известными и секвенированными ДНК генома человека, а также с базами данных уже идентифицированных генов других млекопитающих. Изучение особенностей первичной структуры дополняется специальными тестами для выявления экзон (exon trapping), промоторных участков, поли-А-сигнальных участков.

2) Известно, что в большинстве случаев кодирующие области генов представлены в геноме человека в одном экземпляре и характеризуются большим эволюционным консерватизмом. Существует высокая гомология в структуре ДНК между одинаковыми генами у разных млекопитающих, а также у млекопитающих и других видов животных, геном которых уже хорошо изучен (дрожжи, аскарида, дрозофила). На этом факте основано так называемое *зоо-блот-скринирование* клонированных участков с геномной ДНК разных видов животных (приматов, сельскохозяйственных животных, грызунов, птиц, рептилий и пр.). Обнаружение консервативных гомологичных последовательностей нуклеотидов в изучаемом фрагменте и в геномах других животных рассматривается как веское свидетельство в пользу наличия в нем функционально активного гена. Более того, высокая степень гомологии с уже известными идентифицированными генами других видов позволяет с большой вероятностью предполагать и возможную функцию искомого гена.

3) Решающие доказательства наличия смысловых, функционально активных нуклеотидных последовательностей в структуре анализируемого фрагмента могут быть получены в результате их гибридизации с клонотеками копий кДНК функционально активных генов человека. В настоящее время проведено тотальное выделение всех молекул информационных РНК из различных тканей человека, которые с помощью обратной транскрипции были превращены в копии кДНК, амплифицированные и клонированные вне организма. В распоряжении исследователей имеется свыше 100 клонотек, содержащих в общей сложности более 300 000 таких кДНК, точнее их фрагментов, получивших название *экспрессионные маркерные нуклеотидные последовательности* (expression sequence tags — EST) [Baltimore, 2001].

подавляющее большинство EST уже секвенировано и картировано на генных и хромосомных картах. Конечно, реальное число генов у человека оказалось почти в 10 раз меньше, чем число экспрессионных маркеров, что, по-видимому, объясняется техническими сложностями получения протяженных копий ДНК ак-

тивных генов. Тем не менее, существование таких обширных клонотек кДНК открывает широкие возможности для идентификации смысловых генных последовательностей практически в любых выделенных фрагментах ДНК.

Наличие положительного сигнала гибридизации с определенным клоном EST доказывает не только присутствие смыслового фрагмента ДНК в клонированном участке, но и позволяет судить в определенной мере о функции данного гена в организме.

## Идентификация генов-мишеней

Благодаря значительной протяженности (100 000 п.н. и более) выделенный фрагмент может содержать не один, а несколько разных генов. Нередко идентифицируемый ген находится в непосредственной близости от псевдогена (например, в случае гена *SMN1* при болезни Верднига—Гоффмана или гена *CYP21B* при адреногенитальном синдроме). Следовательно, идентификация самих смысловых участков и даже выделение из фрагмента всего гена-кандидата еще не является завершением поиска и требует прямых доказательств участия обнаруженного гена в патологическом процессе.

Таковыми доказательствами могут быть следующие аргументы:

1) обнаружение измененной нуклеотидной последовательности гена-кандидата у больных соответствующей наследственной болезнью по сравнению с нормой (со здоровыми);

2) наличие экспрессии выявленного гена в тканях или органах, поражаемых наследственным заболеванием;

3) определение первичного биохимического дефекта, обусловленного мутациями в гене-кандидате;

4) коррекция патологического процесса с помощью клонированного гена-кандидата.

Определение нуклеотидной последовательности гена-кандидата у здоровых индивидумов и больных соответствующим заболеванием, как правило, позволяет идентифицировать наличие той или иной мутации. Важно отметить, что при этом следует секвенировать всю геномную последовательность нуклеотидов, так как ряд мутаций, затрагивающих акцепторные сайты сигналов сплайсинга и располагающиеся на стыке экзон-интронных участков, могут быть не обнаружены. Присутствие однотипной мутации у значительного числа больных или обязательное наличие мутаций у больных и их отсутствие в популяции свидетельствуют в пользу правильности идентификации гена-мишени. Именно так была обнаружена знаменитая мутация delF508 — доминирующая мутация гена *CFTR* у больных муковисцидозом.

Вместе с тем следует иметь в виду, что нуклеотидные замены в экзонных частях гена могут быть как истинными мутациями, так и обычными полиморфизмами. Отличить мутации от полиморфизмов далеко не всегда просто.

При этом рекомендуют [Clausters et al., 2000] пользоваться следующими критериями:

- мутации затрагивают эволюционно-консервативную аминокислоту;
- мутации приводят к нарушениям структуры белкового продукта;
- для исключения полиморфизма необходимо тестировать не менее 100 индивидов в популяции;



- у конкретного больного отсутствуют другие изменения нуклеотидной последовательности/мутации данного гена;
- отмечается косегрегация мутации с болезнью в семье высокого риска;
- одна и та же мутация встречается у нескольких неродственных пробандов.

Выявление продуктов экспрессии гена-кандидата в тканях и органах, страдающих при том или ином наследственном заболевании, служит еще одним доказательством правильной идентификации гена-мишени. Для достижения этой цели, как уже упоминалось, проводится гибридизация ДНК гена-кандидата с клонотеками кДНК тотальной мРНК разных органов и тканей. Так, например, наличие положительного сигнала гибридизации для предполагаемого гена муковисцидоза (*CFTR*) было отмечено с клонотеками кДНК поджелудочной железы, потовых желез, кишечника, легких (именно в этих тканях разыгрываются основные патологические процессы, связанные с нарушениями функции хлорных каналов при муковисцидозе).

Идентификация гена-кандидата и его кДНК позволяет получить представление о первичной аминокислотной последовательности белкового продукта соответствующего гена. Сопоставление структуры гена с компьютерным банком данных позволяет определить, к какому семейству белков относится продукт гена-кандидата, а возможность получения антител к этому белку дает возможность точно выяснить его клеточную локализацию и, таким образом, приблизиться к пониманию первичного биохимического повреждения при соответствующем наследственном заболевании.

Описанный способ изучения молекулярных и биохимических основ наследственных болезней получил название методов **обратной генетики**, поскольку в этом варианте путь познания идет не от признака (белкового продукта) к гену, как это было в более ранних генетических исследованиях, а, наоборот, от гена к признаку. Именно путем обратной генетики, т.е. методом позиционного клонирования, в настоящее время обнаружены белковые продукты и выяснены первичные биохимические дефекты большинства известных на сегодняшний день моногенных наследственных болезней. Классическим примером тому является полная драматизма история открытия гена муковисцидоза (*CFTR*) и его белкового продукта – муковисцидозного трансмембранного регулятора проводимости, являющегося, как было впоследствии установлено, белком трансмембранного транспорта ионов хлора [Баранов, Гинтер, 1995].

Однако окончательным доказательством правильности идентификации гена может быть только успешная коррекция первичного биохимического дефекта с помощью найденного гена. Этого можно достигнуть путем введения экспрессирующихся генных конструкций, содержащих кДНК изучаемого гена, в мутантные клетки или в организм животного – биологической модели соответствующего наследственного заболевания. Учитывая определенные методические сложности генотерапевтических исследований на биологических моделях *in vivo* [Баранов, Баранов, 2000], более реальной в большинстве случаев является постановка экспериментов в условиях клеточных культур. Необходимым условием их проведения является наличие первичных или лучше перевиваемых культур мутантных клеток.

## Заключение

Проблема идентификации генов в данной главе в определенной мере изложена в историческом плане. Совершенно очевидно, что расшифровка первичной

структуры всего генома человека, по крайней мере, его основной смысловой части; насыщенность генома высокополиморфными участками, являющимися удобными молекулярными маркерами, позволившими уже сегодня разметить весь геном со средним шагом между маркерами на генетической карте менее 1 сМ (1% кроссинговера); наличие хромосомспецифических и локуспецифических клонотек ДНК, клонированных в различных плазмидных, дрожжевых, фаговых и бактериальных векторах; клонотек экспрессионных кДНК, выделенных из разных тканей; широкие возможности анализа генома человека с помощью биоинформатики и выяснения смысловых нуклеотидных последовательностей качественно изменили подход к идентификации новых генов.

Необходимо также отметить, что согласно итогам программы «Геном человека», после применения в качестве маркеров EST ученые предположили существование свыше 20 000 генов человека. Половина из них уже картирована на хромосомах, и почти 1500 генов идентифицировано, в том числе гены практически всех наиболее частых (около 320) и 170 генов более редких наследственных заболеваний [Baltimore, 2001].

Наконец, качественно новый, современный этап в картировании и идентификации генов ознаменован стремительным нарастанием сведений о числе одонуклеотидных замен (SNP) в геноме человека, которые встречаются через каждые 200–300 п.н. молекулы ДНК [Brooks et al., 2001]. В результате выполнения программы «Геном человека» получены данные о 3,2 млн SNP, многие из которых (около 1,5 млн), как оказалось, находятся внутри смысловых участков (экзонов) структурных генов. Разработаны и уже широко используются принципиально новые высокоэффективные автоматические методы их регистрации, что открывает широкие возможности для автоматизации весьма сложного и трудоемкого процесса идентификации генов [Lehnert et al., 2001; Collins et al., 2001; Cox et al., 2001].

Естественно, что с учетом этого потока информации, уже сегодня имеются все условия для существенного пересмотра алгоритма идентификации новых генов и даже для полной автоматизации этого процесса, по крайней мере, до стадии выделения генов-кандидатов из клонированных геномных фрагментов. Более того, благодаря новым молекулярным технологиям автоматического анализа тысяч аллельных вариантов SNP уже сегодня представляется реальным картирование наследственных признаков, в том числе и наследственных болезней, путем анализа не многих, а только нескольких и даже одной репрезентативной семьи [Xiao et al., 2001]. Все эти методы, однако, не столько актуальны для выявления генов моногенных болезней (см. выше), большинство из которых уже найдены, сколько для генов мультифакториальной патологии, особенности идентификации которых рассмотрены в следующем разделе данной главы.

## Литература

Баранов В.С., Баранов А.Н. Генная терапия моногенных наследственных болезней. Миодистрофия Дюшенна // Вопросы мед. хим. 2000. Т. 46, № 3. С. 279–293.

Баранов В.С., Баранова Е.В., Иващенко Т.Э., Асеев М.В. Геном человека и гены «предрасположенности». Введение в предиктивную медицину. СПб.: Интермедика, 2000. 271 с.

Баранов В.С., Гинтер Е.К. Генетические аспекты муковисцидоза. М., 1995. С. 8–25.

Горбунова В.Н., Баранов В.С. Введение в молекулярную диагностику и генотерапию наследственных заболеваний. СПб.: Специальная литература, 1997. 287 с.

Горбунова В.Н. Молекулярные основы медицинской генетики. СПб.: Интермедика, 1999. 213 с.

Горбунова В.Н. Что вы знаете о своем геноме? СПб.: Интермедика, 2001. 142 с.

Пузырев В.П., Степанов В.А. Патологическая анатомия генома человека. Новосибирск: Наука, 1997. 223 с.

Свердлов Е.Д. Очерки современной молекулярной генетики // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 1995. Прил. № 1, № 2, № 3.

Baltimore D. Our genome unveiled // Nature. 2001. Vol. 409. № 6822. P. 814–815.

Brookes A., Kwok P.-Y., Scott P. et al. From the third international meeting on single nucleotide polymorphism and complex genome analysis. September 8–11. 2000. Taos, New Mexico, USA // Hum. Mutat. 2001. Vol. 17, № 4. P. 241–242.

Clausters M., Guittard C., Bozon D. et al. Spectrum of CFTR mutations in cystic fibrosis and in congenital absence of the vas deferens in France // Hum. Mutat. 2000. Vol. 16, № 2. P. 143–156.

Collins A., Ennis S., Taillon-Miller P. et al. Allelic association with SNPs: metrics, populations and the linkage disequilibrium map // Hum. Mutat. 2001. Vol. 17, № 4. P. 255–262.

Cox D.G., Boillot C., Canzian F. Data mining: efficiency of using sequence databases for polymorphism discovery // Hum. Mutat. 2001. Vol. 17, P. 141–150.

Harrer Th., Schwinger E., Mennicke K. A new technique for cycling in situ amplification and a case report about amplification of a single copy gene sequence in human metaphase chromosomes through PCR-PRINCE // Hum. Mutat. 2001. Vol. 17. P. 131–140.

Lehnert V., Holzwarth J., Ott M. et al. A semi-automated system for analysis and storage of SNPs // Hum. Mutat. 2001. Vol. 17, № 4. P. 243–254.

Poduslo S.E., Dean M., Kolch U., O'Brien T.J. Detection high-resolution polymorphisms in human coding loci by combining PCR and single-strand conformation polymorphisms (SSCP) analysis // Am. J. Hum. Genet. 1991. Vol. 49. P. 106–111.

Terwilliger J.D., Ott J. Handbook for Human Genetic Linkage. Baltimore: J.H. Univ. Press. 1994.

Todd J.A. Le carte des microsatellites est arrivee! // Hum. Mol. Genet. 1992. Vol. 1. № 9. P. 663–666.

Weissenbach J., Gyapay G., Dib C. et al. A second-generation linkage map of the human genome // Nature. 1992. Vol. 359. P. 794–801.

Xiao W., Oefner P.J. Denaturing high-performance liquid chromatography: a review. // Hum. Mutat. 2001. Vol. 17. P. 439–474.

## 1.2. МУЛЬТИФАКТОРИАЛЬНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

В.П. Пузырев, В.А. Степанов

Развитие технологий картирования, построение подробной генетической карты человека, разработка математических и компьютерных методов и моделей

позволили начать систематическое картирование генов, ответственных за сложнонаследуемые (мультифакториальные) заболевания и признаки. Прогресс в картировании генов, отвечающих за менделирующие (т.е. передающиеся потомству по законам Менделя) болезни человека, рано или поздно (по не самым оптимистичным оценкам — в течение ближайшего десятилетия) приведет к тому, что гены всех более или менее часто встречающихся моногенных заболеваний человека будут идентифицированы. Более того, в результате последних достижений геномики появилась возможность продвинуться в изучении до сих пор слабо исследованной области — генетики сложнонаследуемых состояний. С точки зрения генетического анализа, большая часть наиболее распространенных заболеваний человека и признаков, имеющих медицинскую значимость, не следуют простому менделевскому принципу моногенного наследования, а являются результатом действия многих генетических факторов в сочетании с воздействиями среды и случайными причинами, т.е. имеют мультифакториальную природу. В категорию мультифакториальных признаков попадают все основные причины заболеваемости и смертности в современных популяциях человека: атеросклероз, гипертония, многие формы рака, психические заболевания, диабет, бронхиальная астма, ревматоидный артрит, наследственная составляющая чувствительности к инфекциям и, вероятно, значительная компонента общего процесса старения.

К фенотипам, которые не проявляют моногенного доминантного или рецессивного типов наследования, применяют термин «комплексные» или «сложнонаследуемые» признаки (т.е. термин «сложнонаследуемый признак» является более общим по отношению к термину «мультифакториальный признак»). В чем же заключается сложность этих состояний? В общем, осложнения возникают всегда, когда нарушается простое соответствие между генотипом и фенотипом: либо один и тот же генотип в результате влияний окружающей среды или взаимодействия с другими генами дает разные фенотипы, либо различные генотипы проявляются одинаковым фенотипом. Все это в полной мере можно отнести и к моногенным заболеваниям.

Среди основных проблем, затрудняющих генетическое картирование сложнонаследуемых признаков и мультифакториальных заболеваний (МФЗ), можно выделить следующие [Пузырев, Степанов, 1997] (хотя этот список далеко не полный).

**1. Генетические взаимодействия (полигения).** Клинический фенотип может быть результатом действия нескольких (многих) генетических локусов. Вклад каждого индивидуального гена в общую картину формирования признака может быть очень небольшим. Полигенные признаки можно подразделить на *дискретные*, характеризующиеся наличием или отсутствием определенного состояния (например, развития сахарного диабета или инфаркта миокарда), и *количественные*, которые описываются непрерывным рядом изменчивости (например, уровень липидов плазмы, концентрация глюкозы или артериальное давление). Последние определяются совокупным аддитивным эффектом многих индивидуальных генетических локусов (*QTL* — локус количественного признака). В свою очередь, дискретные полигенные признаки могут быть результатом «порогового эффекта», лежащего в их основе количественного признака, либо результатом одновременного действия мутаций нескольких локусов. Примеры первого варианта —

инсулинзависимый сахарный диабет (ИЗСД), артериальная гипертония; второго — одна из форм пигментного ретинита, развивающаяся при наличии мутаций в двух локусах, кодирующих белки сетчатки [Kajiwara et al., 1994].

**2. Генетическая гетерогенность.** Одна и та же фенотипическая картина может быть вызвана мутациями различных генетических локусов — например, мутация, нарушающая функцию любого из генов, контролирующих определенную метаболическую цепочку, приведет к отсутствию или уменьшению концентрации конечного продукта этой цепочки. Генетическая гетерогенность — явление, характерное практически для любого наследственного заболевания человека, в том числе для МФЗ. Последствия генетической гетерогенности с точки зрения картирования заключаются в том, что болезнь может coseгрегировать с определенным генетическим маркером в одной родословной и совершенно с другим — в другой. От собственно генетической гетерогенности (гетерогенности локусов) следует отличать аллельную гетерогенность, когда различные мутации одного локуса затрагивают одну и ту же функцию, но в разной степени и с различными клиническими последствиями. Аллельная гетерогенность, в отличие от локусной, не затрудняет генетическое картирование.

**3. Неполная пенетрантность.** Не у всех носителей мутантного генотипа наблюдается фенотип, отличный от нормы. Мутантный ген может проявиться патологическим фенотипом с определенной (отличной от единицы) вероятностью, которая зависит как от генетического окружения («фона»), так и от негенетических причин — возраста, влияний среды и пр. Поэтому с определенной вероятностью мутантный аллель может присутствовать у практически здоровых людей, а нормальный аллель — у больных.

**4. Наличие фенокopies.** Носители нормального генотипа могут проявлять мутантный фенотип по причинам негенетического характера.

**5. Менделевские механизмы передачи генетической информации.** В последние годы стало очевидно, что наследование по Менделю — лишь один из механизмов передачи генетической информации. Сейчас описано множество болезней, в основе которых лежит митохондриальное наследование, экспансия тринуклеотидных повторов, явление геномного импринтинга и др.

**6. Высокая частота в популяции аллеля, связанного с болезнью.** Нежелательные последствия высокой частоты встречаемости аллеля для картирования заключаются в том, что в родословной может присутствовать несколько копий одного и того же аллеля, но разного происхождения. Например, попытки картировать генетический локус болезни Альцгеймера методом анализа сцепления в родословных долгое время были неудачными. Причина этого стала очевидной, когда выяснилось, что основным генетическим фактором болезни является аллель *E4* гена аполипопротеина *E*, который в европеоидных популяциях встречается с довольно высокой частотой (15–20%) [Corder et al., 1993].

Кроме этих общих проблем генетического картирования сложнаследуемых признаков, существуют и более специфические, связанные с методами набора материала и картирования. Для генетического анализа очень важна правильная постановка диагноза. Ошибки в диагнозе, особенно характерные для случаев, когда диагностика основывается на критериях, далеких от физиологических основ болезни (например, при психических заболеваниях), могут привести как к ложнопозитивной, так и ложнонегативной классификации индивидов, что одинаково

во отрицательно сказывается на перспективе картирования. Даже в тех случаях, когда найдены значимые корреляции между признаком и генетическим маркером, дальнейший анализ может быть затруднен по чисто техническим причинам. Например, «подозреваемый» район генома может оказаться слишком большим, а значит, недоступным современным методам физического картирования. Такая ситуация сложилась сейчас с несколькими локусами сахарного диабета I типа — их место на генетической карте определено, однако эффективное физическое картирование пока невозможно [Todd, 1995].

Затруднения иного рода возникают, если кандидатный ген оказывается сцепленным с другим кандидатным геном. Эта ситуация характерна для генетического картирования многих аутоиммунных заболеваний, основные генетические локусы которых расположены в районе главного комплекса гистосовместимости. На участке размером всего 3 м.п.н. расположены гены 10 семейств, функционирующих в иммунном процессе [Wei et al., 1993], и разобраться в этом комплексе сцепленных локусов крайне сложно.

Отправной точкой для исследований на уровне ДНК (для геномных исследований) служит *генетическая эпидемиология*. Картирование никогда не начинается на пустом месте — ему предшествуют исследования заболевания на популяционном и семейном уровнях. Данные генетико-эпидемиологических исследований позволяют оценить такие важные характеристики как частота болезни в популяции, доля семейных случаев, уровень наследуемости и пенетрантности. Наиболее важным с точки зрения картирования эпидемиологическим параметром является *показатель относительного риска* ( $\lambda$ ), который показывает, насколько риск для родственника больного выше риска в общей популяции. Показатель относительного риска рассчитывается как риск рецидива для родственника больного индивида, относительно частоты болезни в популяции. Для моногенных заболеваний этот показатель очень высок — например, при муковисцидозе показатель относительного риска для сибса ( $\lambda_s$ ) равен 500, при болезни Гиршпрунга — 2000. Для мультифакториальных заболеваний относительный риск значительно ниже. Так, для сахарного диабета типа 1 риск заболевания у братьев и сестер равен 15, для шизофрении — около 9, для диабета типа 2 — 3,5. Естественно, чем выше относительный риск, тем выше доля наследственного фактора в этиологии и патогенезе болезни и тем больше вероятность выявления генетических локусов заболевания.

Первой задачей при отборе клинического материала для эксперимента по картированию является максимальное увеличение относительного риска. Универсальных рецептов для этого нет, однако, чем жестче определение болезни и чем более однородна группа больных, тем более близким к менделевскому и более гомогенным может оказаться признак. Однородный клинический фенотип, ранний возраст проявления болезни, семейное накопление заболевания — вот те критерии, которым необходимо уделять внимание.

Еще один путь улучшить перспективу генетического картирования комплексного признака — провести исследования на редких этнических группах или изолированных популяциях. Ведь согласно теоретическим положениям и данным популяционной генетики для таких групп характерна большая генетическая и аллельная гомогенность, чем для больших смешанных популяций.

Современная стратегия картирования сложна наследуемых признаков и МФЗ включает следующие подходы: анализ сцепления, основанный на проверке кон-

кретной модели наследования болезни в родословных; метод идентичных по происхождению (общих) аллелей; исследование ассоциаций в популяциях и семьях; генетический анализ скрещиваний модельных организмов.

## Анализ сцепления

Этот метод генетического картирования основан на прослеживании косегрегации генов при передаче от родителей к потомкам в ряду поколений. Мы не будем детально описывать тонкости анализа сцепления и вдаваться в сопутствующие статистические проблемы, а остановимся лишь на самых общих положениях. За детальной информацией по методам анализа генетического сцепления читатель может обратиться к соответствующим работам [Terwilliger и Ott, 1994].

Анализ сцепления — это изучение соответствия наблюдаемой картины сегрегации признаков и генетических маркеров в родословной и определенной модели наследования. При этом рассчитываются шансы (вероятности) за и против (т.е. при рекомбинантной фракции  $\theta = 0,5$ ) сцепления в данной семье. Количественным показателем сцепления является логарифм соотношения шансов (правдоподобия) за и против сцепления — лод-балл, который можно вычислить для различных значений рекомбинантной фракции ( $\theta$ ) — от 0 до 0,5. Значение  $\theta$ , при котором лод-балл максимален, и есть наиболее вероятная оценка дистанции между генетическим маркером и предполагаемым геном болезни.

Сцепление считается подтвержденным, если лод-балл превышает определенное пороговое значение. В генетике человека для единичного наблюдения принята величина порога 3,0, что соответствует вероятности сцепления 1000:1. Эта величина не так велика, как может показаться. Ведь для двух случайно выбранных локусов в геноме человека вероятность оказаться несцепленными (т.е. находиться на разных хромосомах или плечах) соотносится с вероятностью быть сцепленными примерно как 50:1. Таким образом, пороговое значение 3,0 означает, что вероятность сцепления всего лишь в 20 раз выше вероятности его отсутствия, или, иными словами, 1 из 20 результатов, подтверждающих сцепление, оказывается ложным.

В настоящее время анализ сцепления проводят, используя большое число маркеров, распределенных по всему геному, — не менее 500 (**мультилокусный анализ сцепления**). При этом рассчитывается соотношение вероятностей для каждого интервала между двумя соседними маркерами. Интервалы со значением лод-балла, превышающим пороговое, и есть наиболее вероятные области локализации гена (**подтверждающее картирование**). В интервалах, для которых лод-балл ниже исключающего порога, локализация гена исключается (**исключающее картирование**). Мультилокусный анализ сцепления требует обширных вычислений, для которых специально разработаны программы — LINKAGE, FASTMAP, EXCLUDE и другие.

*Анализ сцепления является в настоящее время основным методом генетического картирования простых моногенных признаков.* Этим методом были картированы сотни таких признаков, включая многие наследственные болезни. С помощью анализа сцепления картированы и локусы некоторых МФЗ. Простейшая ситуация, в которой могут быть преодолены трудности анализа сложных признаков — анализ сцепления в одной большой разветвленной родословной. Именно так были картированы гены поликистоза почек [Kimberling et al., 1993], ранней формы



болезни Альцгеймера [Schellenberg et al., 1992], псориаза [Tomfohrde et al., 1994] и некоторых других болезней.

В других случаях могут помочь способы увеличения относительного риска (см. выше). Так, ген ранней формы рака груди на хромосоме 17 был картирован методом анализа сцепления при ограничении возраста проявления болезни 47 годами. При этом лод-балл достигал величины, равной 6. При включении в анализ родословных пациенток, имеющих рак груди с более поздним началом заболевания, величина лод-балла опускалась ниже порогового значения.

## Метод идентичных по происхождению аллелей

Классический анализ сцепления является параметрическим методом, т.е. основывается на заранее задаваемых характеристиках, таких как способ наследования и уровень пенетрантности. Неверно заданные параметры могут привести, соответственно, к неверным выводам. Например, неверно заданный тип наследования приводит обычно к переоценке рекомбинантной фракции [Terwilliger и Ott, 1994]. При IBD-анализе (IBD— identical by descent) информацию о сцеплении получают только на основе наследования маркеров в парах больных родственников без априорных предположений о типе наследования и других характеристиках. Такой непараметрический подход менее строг, но, вероятно, более продуктивен: у больных родственников должен выявляться избыток общих аллелей даже при неполной пенетрантности, наличии фенкопий, генетической гетерогенности и высокой частоте аллеля, сцепленного с болезнью в популяции.

Метод общих аллелей позволяет выявить насколько чаще, по сравнению со случайной сегрегацией, пара больных родственников наследует одну и ту же (идентичную по происхождению) копию участка генома (рис. 5). Например, родственные пары (дед—внук, дядя—племянник, двоюродные братья или сестры) могут иметь или не иметь один общий по происхождению аллель по каждому локусу. Вероятность общего аллеля (IBD-показатель,  $\alpha_R$ ) при случайной менделевской сегрегации равна 1/2. Если же маркерный локус сцеплен с болезнью, пары больных родственников должны иметь общий аллель чаще, чем в половине случаев. Для количественного признака степень фенотипического сходства в родственных парах должна коррелировать с долей аллелей, идентичных по происхождению. Анализ общих по происхождению аллелей возможен для любых пар близких родственников, однако на практике чаще всего используют пары больших sibсов. IBD-анализ для такого случая получил название ASP-метода (affected sib-pairs).

С помощью метода идентичных аллелей был картирован на длинном плече хромосомы 11 один из локусов диабета типа 1 [Davies et al., 1994] и показано сцепление артериальной гипертонии с геном ангиотензина [Jeunemaitre et al., 1992], ревматоидного артрита — с локусом *HLA* [Hasstedt et al., 1994], поздней формы болезни Альцгеймера — с локусом на хромосоме 19, а гомосексуальной ориентации — с регионом Xq28 [Hamer et al., 1993]. С появлением подробной генетической карты стало возможным использовать IBD-метод для сканирования всего генома. Такое сканирование было проведено пока лишь считанное число раз [Berrettini et al., 1994]. Однако это положение в ближайшем будущем явно изменится.

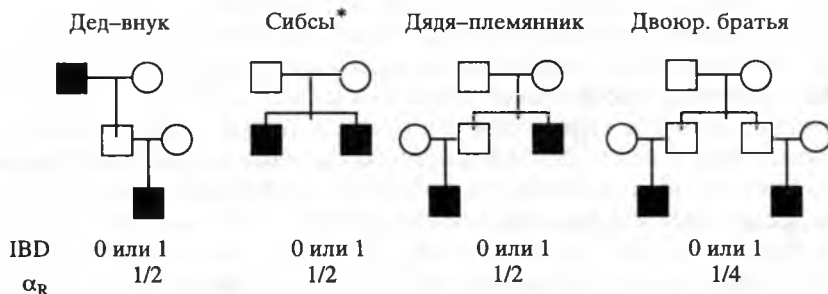


Рис. 5. Метод идентичных по происхождению аллелей

IBD – число аллелей общего происхождения,  $\alpha_R$  – IBD-статистика при случайной менделевской сегрегации (вероятность иметь один идентичный аллель для данной пары родственников)

\* Сибсы рассматриваются как две полусибсовы пары.

В теории метод IBD довольно прост. Однако на практике ситуация выглядит несколько сложнее. Главным ограничением метода общих аллелей до недавнего времени была невозможность в некоторых случаях отличить аллели, идентичные по происхождению, от аллелей, идентичных по состоянию (IBS – identical by state). Другими словами, невозможно было определить, имеют ли два одинаковых аллеля общее происхождение или мы имеем дело с двумя копиями аллеля разного происхождения.

Для преодоления этой трудности существуют различные методы. Простейший заключается в том, чтобы ограничиться только теми парами родственников, для которых IBD-статус можно определить однозначно. Предложено также использовать ожидаемое значение IBD-статистики, рассчитываемое на основе данных по маркерам, IBD-статус которых определяется однозначно. Другой подход основан на применении IBS-статистики вместо IBD [Brown et al., 1994]. Оба подхода на практике дают иногда хорошие результаты, однако их существенный недостаток в том, что они не используют всю имеющуюся информацию о наследовании маркеров, а следовательно, теряют в продуктивности и мощности. Недавно предложен алгоритм, позволяющий извлечь всю возможную информацию из данного набора родословных [Kruglyak et al., 1995]. При этом для каждой точки генома на основе данных по маркерам и рекомбинантной фракции рассчитывается вероятность быть идентичной по происхождению в данной паре родственников. Этот алгоритм реализован в программном пакете MAPMARKER/SIBS [Kruglyak и Lander, 1995].

Хорошей иллюстрацией достоинств IBD-метода является один из первых примеров применения мультилокусного ASP-анализа сложнонаследуемого признака для сканирования всего генома [Hugot и др., 1996]. Авторам удалось картировать один из генов болезни Крона (регионального энтерита) на хромосоме 16 между маркерами *D16S409* и *D16S419*. Авторы использовали две независимые панели семей (всего 78 сибсовых пар) и 270 высокополиморфных маркеров, распределенных по всему геному. Первоначальный параметрический анализ сцепления не позволил картировать ген. Максимальный лод-балл (2,04 для локуса *D16S409*) был значительно ниже, чем предсказанный на основе аутосомно-рецессив-

ной модели. С помощью ASP-анализа на этом же наборе родословных и маркеров был картирован предполагаемый ген болезни Крона на хромосоме 16 на уровне значимости  $p < 0,01$  для обеих независимых панелей семей, несмотря на сравнительно небольшое увеличение относительного риска, связанное с этим локусом.

Интервал, в котором картирован ген болезни Крона, имеет размер около 4 м.п.н. — он слишком велик для эффективного физического картирования. Современные технологии клонирования позволяют идентифицировать ген, если район его предполагаемой локализации ограничен 1 сМ. Какова же «разрешающая способность» метода общих аллелей? По некоторым оценкам [Kruglyak, Lander, 1995] можно рассчитать мощность IBD-метода применительно к высоко-разрешающему позиционному клонированию, сопоставив долю IBD-аллелей с уровнем относительного риска. Признак с очень высокой долей общих аллелей ( $Z_L$ ) в sibсовых парах соответствует простому менделевскому (например, при  $Z_L = 0,975$ ,  $\lambda_s = 40$ ). Для картирования признака с  $Z_L = 0,975$  при разрешении в 1 сМ с 95%-ной вероятностью достаточно 170 мейозов (43 sibсовы пары). Картирование признаков с  $\lambda_s$  от 6 до 40 с таким же разрешением потребует примерно вдвое большую выборку семей. При дальнейшем уменьшении относительного риска и, следовательно, доли общих аллелей, требования к размеру выборки резко возрастают.

## Ассоциации в популяциях и семьях

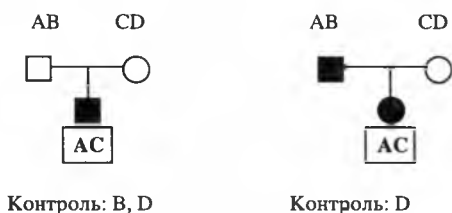
Исследование ассоциаций, в отличие от двух предыдущих методов генетического картирования, основано не на анализе косегрегации генетического материала в семьях, а на поиске популяционных корреляций в частотах аллелей. В классическом случае они представляют собой сравнение больных индивидов со здоровыми — из той же популяции. Генетический маркер (аллель данного гена) считается ассоциированным с болезнью, если его частота среди больных значительно выше, чем в контрольной выборке.

Исторически исследование ассоциаций сыграло решающую роль в выявлении генетической компоненты аутоиммунных и сердечно-сосудистых заболеваний. Анализ популяционных ассоциаций показал вовлеченность комплекса HLA в этиологию таких связанных с иммунными нарушениями состояний, как диабет типа 1, множественный склероз, ревматоидный артрит, системная волчанка, и позволил выявить роль наследственной вариабельности генов метаболизма липидов (аполипопротеина В, рецептора липопротеинов низкой плотности, кластера генов аполипопротеинов *A1-C3-A4* и др.) в этиопатогенезе атеросклероза и нарушений липидного обмена [Степанов и др., 1992; 1995]. Из других примеров ассоциаций можно назвать исследования, показавшие ключевую роль гена *ApoE* в болезни Альцгеймера [Corder, 1993], и участие ангиотензин конвертирующего фермента в этиопатогенезе инфаркта миокарда. Применительно к моногенным признакам ассоциации успешно использовались для дальнейшего уточнения локализации гена, первоначально обнаруженного методами анализа сцепления. Такой подход был применен при картировании муковисцидоза, хореи Гентингтона, болезни Вильсона—Коновалова и др. [Jorde et al., 1994].

В основе ассоциации генетического маркера с болезнью могут лежать три причины. Во-первых, наличие ассоциации может свидетельствовать о том, что

**Рис. 6.** Поиск ассоциаций на семейном материале

АФВАС-метод: контрольную популяцию составляют маркерные родительские аллели, которые не передаются больным детям



ассоциированный локус и есть ген или один из генов болезни. В этом случае следует ожидать, что положительная ассоциация будет иметь место во всех популяциях. Во-вторых, причиной ассоциации может быть неравновесие по сцеплению между маркерным локусом и локусом болезни. Это возможно в том случае, когда ассоциированный аллель находился на предковой хромосоме, а сам локус расположен достаточно близко к локусу болезни, чтобы эта связь не была нарушена рекомбинацией за время существования популяции. И, наконец, ассоциация может быть артефактом, возникшим вследствие подразделенности популяции.

При проведении генетического картирования важно отделить два первых случая от третьего. Этого можно добиться, исследуя ассоциации в гомогенных изолированных популяциях, используя внутрисемейный контроль или проводя тест на неравновесие при передаче.

Наиболее перспективными для идентификации генов комплексных состояний являются исследования ассоциаций на семейном материале [Thomson, 1995]. При этом контрольную популяцию аллелей составляют здоровые аллели родителей, которые не передаются больным детям. Этот подход называется **АФВАС-методом** (affected family-based control) (рис. 6). В первой родословной родители имеют генотипы АВ и CD, а больной ребенок – генотип АС. Следовательно, аллели В и D, не передавшиеся потомку, составят контрольную популяцию. Для второй родословной в контрольную группу войдет аллель D. Если имеется большая выборка подобных родословных, можно сравнить частоты аллелей А, В, С и D у больных и в контроле и выявить возможные ассоциации. Поскольку используются ядерные семьи, родительские аллели, не сцепленные с геном или генами болезни, будут всегда сегрегировать независимо от аллелей гена предрасположенности к болезни. Таким образом, устраняются эффекты, связанные с подразделенностью популяции и выявляются ассоциации только для маркеров, физически сцепленных с локусом болезни.

Исследование ассоциаций на ядерных семьях позволило подтвердить роль гена инсулина при сахарном диабете типа 1, для которого ранее были показаны ассоциации на популяционном уровне, и помогло выявить маркеры, сцепленные с полипозом толстой кишки [Hastbacka et al., 1994]. В принципе, АФВАС-метод вполне приемлем и для полного геномного скрининга, однако примеры таких исследований нам пока не известны.

К группе «семейных» (family-based) тестов на сцепление и ассоциацию относится и тест на неравновесие при передаче (TDT – transmission disequilibrium test). TDT был впервые предложен Spielman и коллегами в 1993 г. при анализе сцепления маркерных аллелей с сахарным диабетом типа 1. Идея этого теста очень проста: если какой-то аллель изучаемого локуса ассоциирован с заболева-

нием, то он должен чаще по сравнению с другими аллелями того же локуса встречаться у больных людей. Для проверки этого в TDT используется сравнение частот аллелей, унаследованных и не унаследованных больными потомками от своих родителей. Такой же подход применяется и в других аналогичных тестах, однако специфической особенностью TDT является то, что в расчет принимаются аллели, полученные только от гетерозиготных по изучаемому локусу родителей. В связи с этим, результаты теста становятся независимыми от эффектов популяционной структуры (подразделенность, метисация, инбридинг). Это является наиболее значимым преимуществом TDT перед аналогичными тестами.

Другим важным обстоятельством является простота расчетов статистики TDT. В «классическом» случае подсчет осуществляется по формуле:

$$TDT = \frac{(a - b)^2}{a + b},$$

где  $a$  — число случаев, когда больные потомки наследуют аллель  $M_1$  от родителей с генотипом  $M_1M_2$ ;  $b$  — то же для аллеля  $M_2$ .

Распределение статистики TDT соответствует  $\chi^2$  с одной степенью свободы (в случае, когда исследуемый локус является диаллельным). Если же значение TDT превышает критическую величину  $\chi^2$  на определенном уровне значимости (например, 3,84 для  $p = 0,05$ ), то тот аллель, который чаще встречается у больных, можно считать ассоциированным с заболеванием.

Изначально TDT был предложен как тест на сцепление, как тест на ассоциацию он может быть использован только в том случае, когда анализируются случаи наследования аллелей одним больным потомком (симплексные данные). Когда в семье присутствуют два или более больных потомков одних и тех же родителей, исследователь для анализа случайным образом выбирает одного из них. При этом, естественно, происходит потеря информации. Чтобы этого избежать, для расчетов TDT используют специальные статистические процедуры, например, стохастическое моделирование по алгоритму Монте—Карло.

Среди других подобных тестов TDT обладает самой высокой способностью определения сцепления или ассоциации. Другим преимуществом теста является то, что его разрешающая сила практически не зависит от тестируемой модели наследования при анализе сцепления. Наиболее эффективен TDT при анализе аддитивной модели наследования.

Все эти обстоятельства обусловили большой интерес к TDT как методу картирования генов у человека. Практически ни одно ассоциативное исследование или анализ сцепления не обходится сейчас без TDT. Разработаны его многочисленные модификации для некоторых «особых» случаев: для мультиаллельных генетических маркеров, исследования sibсовых пар, изучения количественных признаков, анализа X-сцепленной патологии и случаев геномного импринтинга и т.д.

Еще одной потенциально мощной стратегией генетического картирования является поиск ассоциаций в изолированных популяциях с небольшим числом основателей. Этот подход называется *картированием с помощью неравновесия по сцеплению*. Лежащая в его основе идея проста: чем более высокая степень генетической изоляции характерна для такой популяции, тем больше доля больных, унаследовавших ген болезни от общего предка и, соответственно, тем больше ве-

роятность, что причиной ассоциации является физическое сцепление маркера с геном болезни. Ассоциацию в изолированной популяции можно интерпретировать и с точки зрения метода общих аллелей. Все члены изолированной популяции являются, в определенной степени, дальними родственниками. Сравнивая частоту аллелей у больных и в контроле, мы, таким образом, оцениваем долю общих аллелей у дальних родственников, используя не только мейозы в данном поколении, но и все мейозы в истории популяции. Сейчас в работах по картированию наиболее активно используется в качестве генетического изолята финская популяция. Стратегия картирования по неравновесию недавно была успешно применена для поиска гена дистрофической дисплазии (*DTD*) — моногенного менделевского заболевания. Традиционные методы анализа сцепления позволили локализовать ген *DTD* в районе размером 2 м.п.н., а затем анализ неравновесия по сцеплению в финской популяции сузил этот регион до 40 т.п.н., что позволило клонировать ген [Hastbacka et al., 1994]. Подобная технология применима и для сложнаследуемых состояний, хотя доля больных, имеющих общего предка, в этом случае должна быть меньше. Сейчас на финской популяции ведется картирование по неравновесию локусов предрасположенности к системной волчанке и некоторым другим МФЗ [Krahe et al., 1996].

## Экспериментальные скрещивания модельных организмов

Экспериментальные скрещивания животных являются одним из важнейших методов генетического картирования. Возможность получить большое число потомков от одного скрещивания и использование чистых линий полностью устраняют проблему генетической гетерогенности. Экспериментальные манипуляции и скрещивания позволяют получать *конгенные линии* — т.е. линии, отличающиеся только по одному нужному участку генома вплоть до одного локуса. Крайне привлекательной для исследования мультифакториальных заболеваний является возможность унифицировать условия окружающей среды. Эти преимущества дают возможность изучения гораздо более сложных генетических взаимодействий, чем это возможно на родословных человека. Наиболее ярко это иллюстрируется на примерах разложения количественных признаков до генетических составляющих — у человека исследования такого рода пока невозможны. Сейчас, когда созданы подробные карты генетического сцепления мыши и крысы [Copeland et al., 1993; Dietrich et al., 1994], стало возможным интервальное картирование локусов количественных признаков. Впервые картирование QTL на всем геноме было проведено при исследовании эпилепсии у мышей и гипертонии у крыс. В последнем случае эти работы послужили основанием для параллельных исследований у человека, с помощью которых было выявлено сцепление гена ангиотензин конвертирующего фермента с гипертонией.

Главная проблема, связанная с генетическим картированием на экспериментальных объектах — перенос этих результатов на человека. Существуют два пути — *функциональный*, т.е. исследование генетического контроля аналогичных метаболических путей, и *позиционный* — исследование участков генома человека, гомологичных соответствующим мышинным.

В настоящее время получены экспериментальные модели многих МФЗ человека — инсулинзависимого [de Gouyon et al., 1993] и независимого [Gauguier et al., 1996; Galli et al., 1996] диабета, рака [Dietrich et al., 1993], гипертонии, атеро-

склероза [Breslow, 1993], эпилепсии, множественного склероза [Roder, Hickey, 1996], астмы [de Sanctis et al., 1995], дефектов нервной трубки [Neumann, 1994], и таких поведенческих количественных признаков, как предпочтение пищевых субстратов (алкоголя, морфина, кокаина) [Berretini et al., 1994].

## Литература

- Пузырев В.П., Степанов В.А.* Патологическая анатомия генома человека. Новосибирск: Наука. 1997. 244 с.
- Степанов В.А., Лемза С.В., Пузырев В.П.* Генетика нарушений метаболизма липопротеинов. Томск: Изд-во Томского гос. унив. 1992. 141 с.
- Степанов В.А., Пузырев В.П., Лемза С.В.* и др. Взаимосвязь структурных вариантов гена аполипопротеина с ишемической болезнью сердца и уровнем липидов плазмы крови // Генетика. 1995. Т. 31., № 3. С. 405–409.
- Berrettini W.H., Ferraro T.N., Goldin L.R.* et al. Chromosome 18 DNA markers and manic-depressive illness: evidence for a susceptibility gene // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. Vol. 91. P. 5918–5921.
- Breslow J.L.* Transgenic mouse models of lipoprotein metabolism and atherosclerosis // Ibid. 1993. Vol. 90. P. 8314–8318.
- Brown D.L., Gorin M.B., Weeks D.E.* Efficient strategies for genomic searching using the affected-pedigree-member method of linkage analysis // Am. J. Hum. Genet. 1994. Vol. 54. P. 544–552.
- Copeland N.G.* et al. A genetic linkage map of the mouse // Science. 1993. Vol. 262. P. 57–66.
- Corder E.H., Saunders A.M., Strittmatter W.J.* et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families // Ibid. 1993. Vol. 261. P. 921–923.
- Curtis D., Gurling H.* A procedure for combining two-point lod-scores into a summary multipoint map // Hum. Hered. 1993. Vol. 43. P. 173–185.
- Davies J.L., Kawaguchi Y., Bennett S.T.* et al. A genome-wide scan for human type 1 diabetes susceptibility genes // Nature. 1994. Vol. 371. P. 130–136.
- De Gouyon B., Melanitou E., Richard M.F.* et al. Genetic analysis of diabetes and insulinitis in an interspecific cross of the nonobese diabetic mouse with *Mus spretus* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. Vol. 90. P. 1877–1881.
- De Sanctis G.T., Mercant M., Beier D.R.* et al. Quantitative locus analysis of airway hyperresponsiveness in A/J and C57BL/6J mice // Nature Genet. 1995. Vol. 11. P. 150–154.
- Dietrich W.F.* et al. Genetic identification of Mom-1, a major modifier locus affecting Min-induced intestinal neoplasia in the mouse // Cell. 1993. Vol. 75. P. 631–639.
- Dietrich W.F.* et al. A genetic map of the mouse with 4.006 simple sequence length polymorphisms // Nature Genet. 1994. Vol. 7. P. 220–245.
- Galli J., Li L.S., Glaser A.* et al. Genetic analysis of non-insulin dependent diabetes mellitus in the GK rat // Ibid. 1996. Vol. 12. P. 31–37.
- Gauguier D., Froguel P., Parent V.* et al. Chromosomal mapping of genetic loci associated with non-insulin dependent diabetes in the GK rat // Ibid. 1996. Vol. 12. P. 38–43.
- Hamer D.H., Hu S., Magnuson V.L.* et al. A linkage between DNA markers on the X chromosome and male sexual orientation // Science. 1993. Vol. 261. P. 321–327.
- Hasstedt S.J., Clegg D.O., Ingles L.* et al. HLA-linked rheumatoid arthritis // Am. J. Hum. Genet. 1994. Vol. 55. P. 738–746.

*Hastbacka J., de la Chapelle A., Mahtani M.M.* The diastrophic dysplasia gene encodes a novel sulfate transporter: positional cloning by fine-structure linkage disequilibrium mapping // *Cell*. 1994. Vol. 78. P. 1073–1087.

*Hugot J.-P., Laurent-Puig P., Gower-Rousseau C.* et al. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16 // *Nature*. 1996. Vol. 379. P. 821–823.

*Jeunemaitre X., Soubrier F., Kotelevtsev Y.V.* et al. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen // *Cell*. 1992. Vol. 71. P. 169–180.

*Jorde L.B., Watkins W.S., Carlson M.* et al. Linkage disequilibrium predicts physical distance in the adenomatous polyposis coli // *Am. J. Hum. Genet.* 1994. Vol. 54. P. 884–898.

*Kajiwara K., Berson E.L., Dryja T.P.* Digenic retinitis pigmentosa due to mutations at the unlinked peripherin/RDS and ROM1 loci // *Science*. 1994. Vol. 264. P. 1604–1608.

*Kimberling W.J., Kumar S., Gabow P.A.* et al. Autosomal dominant polycystic kidney disease: localization of the second gene to chromosome 4q13-q23 // *Genomics*. 1993. Vol. 18. P. 467–472.

*Krahe R., Julkunen H., Ignatius J.* et al. Genetic dissection of complex disease in isolated populations: linkage disequilibrium mapping of two SLE candidate susceptibility genes in the Finnish population (abstract) // *Am. J. Hum. Genet.* 1996. Vol. 59. A384.

*Kruglyak L., Lander E.S.* Complete multipoint sib-pair analysis of qualitative and quantitative traits // *Am. J. Hum. Genet.* 1995. 57. P. 439–454.

*Kruglyak L., Daly M.J., Lander E.S.* Rapid multipoint linkage analysis of recessive traits in nuclear families, including homozygosity mapping // *Ibid.* 1995. Vol. 56. P. 519–527.

*Neumann P.E., Frankel W.N., Letts V.A.* et al. Multifactorial inheritance of neural tube defects: localization of the major gene and recognition of modifiers in ct mutant mice // *Nature Genet.* 1994. Vol. 6. P. 357–362.

*Roder J., Hickey W.F.* Mouse models, immunology, multiple sclerosis and myelination // *Ibid.* 1996. Vol. 12. P. 6–8.

*Schellenberg G. D., Bird T. D., Wijsman E. M.* et al. Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14 // *Science*. 1992. Vol. 258. P. 668–671.

*Spielman R.S., McGunis R.E., Ewens W.J.* Transmission test for linkage disequilibrium: The insulin gene region and insulin dependent diabetes-mellitus (IDDM) // *Am. J. Hum. Genet.* 1993. Vol. 52. P. 506–516.

*Terwilliger J.D., Ott J.* Handbook of human genetic linkage. Baltimore: John Hopkins University Press. 1994.

*Thomson G.* Mapping disease genes: family-based association studies // *Am. J. Hum. Genet.* 1995. Vol. 57. P. 487–498.

*Todd J.A.* Genetic analysis of type 1 diabetes using whole genome approaches // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995. Vol. 92. P. 8560–8565.

*Tomfohrde J., Silverman A., Barnes R.* et al. Gene for familial psoriasis susceptibility mapped to the distal end of human chromosome 17q // *Science*. 1994. Vol. 264. P. 1141–1145.

*Wei H., Fan W.F., Xu H.* et al. Genes in one megabase of the HLA class I region // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993. Vol. 90. P. 11870–11874.



# Мутации. Классификация, номенклатура, механизмы возникновения, методы диагностики

*В.С. Баранов, Т.Э. Иващенко*

Наследственные болезни, так же как и генетическая предрасположенность к мультифакториальным заболеваниям, являются результатом мутаций соответствующих генов, по-разному влияющих на функциональную активность их аллелей. Поэтому естественно при описании вклада геномики в диагностику, профилактику и лечение наследственных болезней напомнить некоторые общие положения, касающиеся классификации мутаций, их современной номенклатуры, механизмов возникновения и методов идентификации. Достаточно подробно все эти понятия ранее уже рассматривались в ряде монографий, выполненных в рамках программы «Геном человека» [Горбунова, Баранов, 1997; Пузырев, Степанов, 1997; Горбунова, 1999; Баранов и др., 2000], в серии глав методических руководств [Баранов и др., 1997; Иващенко и др., 1999], а также в многочисленных монографиях по медицинской генетике [Бочков, Чеботарев, 1989; Фогель, Мотульский, 1990; Бочков, 1997].

Данная глава кратко суммирует основные положения, при этом внимание обращено на принципиально новые методы и разработки, позволяющие с высокой эффективностью проводить идентификацию как новых мутаций, так и полиморфных аллельных вариантов в геноме человека.

## 2.1. НЕКОТОРЫЕ ОБЩИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ. МУТАЦИИ И ПОЛИМОРФИЗМЫ

Общая классификация мутаций на уровне целого генома и молекулы ДНК представлена на рис. 7. Изменения содержания ДНК, кратные геному или связанные с различными хромосомными перестройками, относятся к геномным мутациям и не будут рассматриваться в данном разделе. Причиной моногенных и мультифакториальных заболеваний в основном являются спонтанные или индуцированные изменения в нуклеотидной последовательности ДНК.

Как известно, каждый генетический локус характеризуется определенным уровнем изменчивости, т.е. присутствием различных аллелей или вариантов последовательностей нуклеотидов у разных индивидуумов. В целом, на долю таких индивидуальных изменений приходится только около 0,1% всей ДНК генома человека, причем основные вариации касаются однонуклеотидных замен, SNP.

## МУТАЦИИ

### Геномные

#### *Диплоидия*

*Гетероплоидия* – гаплоидия и полиплоидия

(триплоидия,  
тетраплоидия,  
пентаплоидия)

*Анеуплоидия* (трисомия, моносомия, нуллисомия)

*Структурные aberrации* – делеции, дупликации, инверсии, инсерции, транслокации – реципрокные, нереципрокные (робертсоновские)

### Генные

#### *Точечные (сайтовые) мутации*

нейтральные замены – SNP (через каждые 1000 п. о.)

нонсенс – стоп-кодон

миссенс – другой кодон

*внутригенные перестройки:*

делеции

дупликации

инверсии

инсерции

#### *Перемещение мобильных элементов*

Alu 300-500 п.о. – до 100 000 копий на геном

LINE 6500 п.о. – до 50 000 копий на геном

#### *Динамические мутации*

$(CAG)_n; (GGG)_n$

**Рис. 7.** Классификация мутаций

Применительно к гену, аллели разделяют на две группы – *нормальные*, или аллели дикого типа, и *мутантные*, приводящие к различным вариациям или нарушениям работы гена. В любых популяциях и для любых генов аллели дикого типа являются преобладающими. Вообще *под мутацией понимают любое изменение в нуклеотидной последовательности ДНК, независимо от локализации и влияния на жизнеспособность*. В научной литературе сравнительно часто встречающиеся в

популяциях варианты участков генов, не приводящие к заметным нарушениям функций, обычно рассматриваются как *нейтральные мутации* или *генетические полиморфизмы*, тогда как понятия «мутация» и «мутантный аллель» обычно употребляются как синонимы.

Изменения в нуклеотидной последовательности по-разному проявляются в фенотипе. Часть из них не оказывает никакого влияния на структуру и функцию соответствующего белка. Это фенотипически молчащие, нейтральные мутации — варианты генетического полиморфизма (ГП), которые не затрагивают структуру самого гена, его регуляторных участков или не приводят к заменам аминокислот в пептидной цепочке вследствие «вырожденности» генетического кода (большинство аминокислот кодируется несколькими триплетными кодонами). В свою очередь, мутантные аллели могут быть подразделены на три класса:

- 1) мутации, ведущие к потере функции (loss-of-function);
- 2) мутации, сопровождающиеся количественными изменениями соответствующих мРНК и первичных белковых продуктов;
- 3) доминантно-негативные мутации, изменяющие свойства белковых субъединиц таким образом, что они вызывают повреждающий эффект в экспрессирующих их клетках (gain-of-function).

Наибольшим повреждающим действием обладают мутации, блокирующие синтез белка, приводящие к образованию бессмысленного продукта, либо к преждевременному окончанию его синтеза. Такие неполноценные (truncated) белки неспособны к модификациям и быстро деградируют.

Частоты мутаций, приводящих даже к наиболее распространенным наследственным заболеваниям, сравнительно невелики и обычно значительно ниже 1% [van Ommen et al., 1999]. Например, популяционные частоты мутаций, ответственных за такие генные болезни, как гемофилия А, миодистрофия Дюшенна или фенилкетонурия, значительно ниже 1: 2–5000 индивидуумов. В отличие от мутаций генетические полиморфизмы встречаются чаще и могут захватывать значительную часть популяции, в среднем, около 1–2%.

Необходимо отметить, что разница между мутациями и генетическими полиморфизмами весьма относительна. Она скорее количественная, чем качественная. Однако и эта особенность далеко не абсолютна. Нередко тяжелые мутации, практически полностью выключающие работу генов, встречаются в популяции чаще, чем многие генетические полиморфизмы. Так, известно, что в результате протяженной делеции в гене *GSTM1* почти половина представителей белой расы не имеет одного из ферментов детоксикации ксенобиотиков — глутатион-S-трансферазы М1. Тем не менее эта мутация чаще рассматривается в разделе генетического полиморфизма. С другой стороны, 10–20% всех представителей белой расы Западной Европы являются гетерозиготными носителями мутаций гена *CFTR*, которые в гомозиготном состоянии приводят к одному из наиболее частых тяжелых моногенных заболеваний — муковисцидозу. При этом на долю только одной мутации delF508 приходится почти 60–70% всех мутаций гена *CFTR* [Estivill et al., 1997; Ивашенко, 2002]. Поскольку в гетерозиготном состоянии delF508 присутствует почти у 5% населения Европы, формально ее можно рассматривать как генетический полиморфизм.

Другое, еще менее очевидное, отличие мутаций и генетических полиморфизмов касается их влияния на функции гена. Обычно генетические полиморфизмы

не нарушают генную активность, тогда как мутации, как правило, ассоциируют с теми или иными генными болезнями. Вместе с тем, по крайней мере, некоторые генетические полиморфизмы, в особенности внутригенные или находящиеся в регуляторных сегментах гена, отнюдь не являются функционально нейтральными и могут неблагоприятно сказываться на функциях соответствующих аллелей. В типичном случае внутригенные SNP могут приводить к изменению генетического кода и, как следствие этого, к замене в полипептидной цепочке одной аминокислоты. Как правило, новый белковый продукт такого гена выполняет свои функции хуже его немутантной формы (аллеля дикого типа), что может предрасполагать к различным заболеваниям мультифакториальной природы (см. гл. 1).

Таким образом, генетические полиморфизмы и мутации суть явления одного порядка; грань между этими понятиями весьма условна, как зачастую условно разделение понятия нормы и патологии [Cotton, Scriver, 1998].

## 2.2. КЛАССИФИКАЦИЯ МУТАЦИЙ, МЕХАНИЗМЫ ИХ ВОЗНИКНОВЕНИЯ

Подавляющее большинство мутаций является результатом замен одного нуклеотида в смысловой части гена (экзоне). Эти замены обычно происходят во время репликации (удвоения) ДНК при подготовке клетки к делению. Хотя процесс репликации чрезвычайно точен и существует сложная система ферментов узнавания и исправления (репарации) ошибок репликации, тем не менее, ошибки встречаются, в среднем, с частотой  $10^{-9}$ – $10^{-11}$  на один включенный нуклеотид [Krawczak, Cooper, 1996]. Другим важным источником точечных (нуклеотидных) замен является мутагенное воздействие радиации или химических веществ на структуру ДНК. Следовательно, точечные мутации (нуклеотидные замены) могут быть следствием действия химических, физических и эндогенных факторов. Особенно важную роль в увеличении спонтанной частоты точечных замен могут играть мутации в генах репарации (*MLH1*, *MSH2*, *MSH3*, *PMS1*, *PMS2*), нормальная функция которых является критической для поддержания стабильности генома [Lipkin et al., 2001].

Точечные замены в кодирующих участках ДНК могут быть причиной различных мутаций, тип которых полностью определяется природой нуклеотидной замены, т.е. тем, каким становится трехбуквенный код (кодон) нуклеотидной последовательности ДНК после замены. Так, в случае *нонсенс* (nonsense) мутации замена нуклеотида в кодирующей части гена приводит к образованию *стоп-кодона* – триплета, на котором прекращается трансляция и, соответственно, синтез белка на рибосомах в цитоплазме клетки. В случае *миссенс* (missense) мутации возникает триплет, соответствующий кодону другой, отличной от нормальной последовательности аминокислоты, которая и оказывается включенной в полипептидную цепь мутантного белка. Точечная мутация в виде утраты или вставки одного или двух нуклеотидов (frameshift) может приводить к сдвигу рамки считывания, образованию преждевременного стоп-кодона и к остановке трансляции. Наконец, точечные замены нуклеотидов на границе экзон-интронных стыков могут нарушать процесс узнавания сигнальных последовательностей нуклеотидов соответствующими молекулами РНК (т.н. U-РНК) и быть

причиной нарушения сплайсинга. Это так называемые *сплайсинговые мутации* [Сингер, Берг, 1998]. При этих мутациях наблюдается утрата соответствующего экзона либо, наоборот, сохранение продукта транскрипции соседнего интрона. В обоих случаях структура вторичного РНК-транскрипта (и РНК – информационной РНК) и синтез кодируемого им белка оказываются нарушенными.

Следует отметить, что точечные мутации, как правило, имеют не случайное расположение в геноме и даже в отдельных генах. Нередко они сосредоточены в каких-то ограниченных участках ДНК. Отмечено, что особенно часто нуклеотидные замены затрагивают области CpG-островков – участков ДНК длиной 200–300 п.о., обычно расположенных в начале транскрибируемой (смысловой) части многих структурных генов (особенно генов «домашнего хозяйства») [Krawczak, Cooper, 1996].

К другим типам генных мутаций относятся *делеции* (отсутствие фрагментов ДНК разной протяженности), *дупликации* (удвоенные фрагменты ДНК), *инсерции* (вставленные фрагменты ДНК), *транслокации* (обмен фрагментами ДНК между разными генами или хромосомами). Часть таких мутаций (дупликации, делеции, инсерции) вызывают генетический дисбаланс и приводят к серьезным нарушениям синтеза белка, тогда как другие (инверсии, транслокации), обычно не сопровождающиеся утратой или приобретением генетического материала или его разрывами, могут никак не проявляться в фенотипе, т.е. вести себя как типичные «нейтральные» мутации [Горбунова, Баранов, 1997].

Отдельный тип представлен так называемыми «динамическими» мутациями, которые характеризуются нарастанием числа триплетных (а в некоторых случаях и более протяженных) повторов в кодирующих или некодирующих частях генов. Этот новый класс мутаций, как установлено, характерен для весьма полиморфной группы наследственных заболеваний, называемых «болезнями экспансии» [Иллариошкин, Иванова-Смоленская, 1995]. Увеличение числа повторов может по-разному сказываться на функциях соответствующих генов. В случае нейродегенеративных заболеваний, таких как хорea Гентингтона, болезнь Кеннеди, болезнь Джозефа–Мачадо, ряд спиноцеребеллярных атаксий, нарастание числа кодонов CAG ведет к синтезу белков с необычно длинными монотонными трактами глутаминовой аминокислоты. Такие белки, как оказалось, обладают токсичным действием, вызывая избирательную гибель нервных клеток определенного типа (мутации типа gain-of-function).

При других наследственных заболеваниях (синдроме ломкой X-хромосомы, миотонической дистрофии, атаксии Фридрейха, одной из редких форм эпилепсий) увеличение числа триплетных повторов (CGG, CTG, GAA) нарушает транскрипцию и приводит к дефициту соответствующих белков (мутации типа loss-of-function).

В основе механизма экспансии, как предполагается, лежит нарушение процесса репликации микросателлитной ДНК, в частности, скольжение (slippage) в репликативной вилке. Вместе с тем целый ряд молекулярных аспектов в патогенезе болезней экспансии и их наследовании все еще остается непонятным и продолжает активно изучаться [Мальшева, 2001].

Специального рассмотрения заслуживают мутации, обусловленные инсерцией протяженных мобильных элементов генома типа LINE, SINE, Alu, транспозонов, на долю которых приходится до 5% ДНК всего генома. В настоящее время

получены прямые доказательства связи внутригенных перемещений этих элементов с возникновением ряда наследственных заболеваний (например, гемофилии А, нейрофиброматоза, миопатии Шарко–Мари–Тус), а также предрасположенности к ишемической болезни сердца и гипертонии, синдрому Альпорта, раку толстого кишечника [Баранов и др., 2000]. В настоящее время известно в общей сложности 16 мутаций структурных генов, связанных с инсерцией Alu; 12 мутаций, обусловленных инсерцией длинных повторов LINE и 2 – коротких SINE [Xuemin et al., 2001].

### 2.3. НОМЕНКЛАТУРА МУТАЦИЙ

Разработана и постоянно совершенствуется система записи различных типов мутаций, а также генных полиморфизмов. Последний вариант такой номенклатуры, одобренный Международным комитетом, принят в 1996 г. [Beudet, Tsui, 1993]. Основные положения этого варианта подробно рассмотрены нами ранее [Горбунова, Баранов, 1997]. Система рассчитана на запись аминокислотных замен в белках, нуклеотидных замен и перестановок в ДНК. Каждой аминокислоте соответствует однобуквенный символ (табл. 4), слева записывается нормальный вариант аминокислоты, справа – мутантный, а номер в центре соответствует месту замены в пептидной цепочке. Например, запись D44G означает замену аспарагина на глицин в 44-м положении полипептидной цепи, а A655E – аланина на глутамин в положении 655 белкового продукта. Так записываются различные варианты аминокислотных замен при миссенс мутациях. Буквой X обозначается место останковки синтеза полипептидной цепи при нонсенс мутациях. Например, Q39X означает замену глицина на стоп-сигнал в 39-м кодоне, а W1282X – триплетта, кодирующего триптофан на стоп-кодон в положении 1282. Отсутствие аминокислоты обозначают значком «Δ» – дельта. Например, ΔF508 означает отсутствие фенилаланина в 508 положении трансмембранного регуляторного белка муковисцидоза.

Таблица 4

Обозначение аминокислотных остатков

Аминокислота	Трехбуквенное обозначение	Однобуквенное обозначение	Аминокислота	Трехбуквенное обозначение	Однобуквенное обозначение
Аланин	Ala	A	Изолейцин	Ile	I
Аргинин	Arg	R	Лейцин	Leu	L
Аспарагин	Asn	N	Лизин	Lys	K
Аспарагиновая кислота	Asp	D	Метионин	Met	M
Цистеин	Cys	C	Фенилаланин	Phe	F
Глутамин	Gln	Q	Пролин	Pro	P
Глутаминовая кислота	Glu	E	Серин	Ser	S
Глицин	Gly	G	Треонин	Thr	T
Гистидин	His	H	Триптофан	Trp	W
			Тирозин	Tyr	Y
			Валин	Val	V

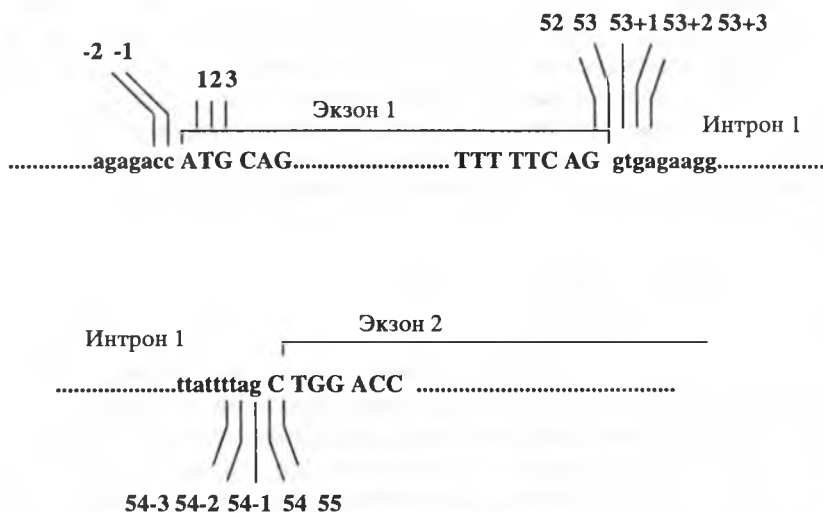


Рис. 8. Принцип нумерации нуклеотидов в гене

Принципиальная схема записи и нумерации нуклеотидов приведена на рис. 8. Отсчет нуклеотидов в молекуле ДНК начинается с первого смыслового кодона, так что нуклеотид под номером +1 соответствует первому нуклеотиду в молекуле кДНК. Вверх по течению (или справа налево от 3' к 5'-концу) от первого кодона нуклеотиды записывают со знаком «-», вниз по течению (от 5' к 3') — со знаком «+». Нуклеотиды экзонов обозначают прописными буквами, интронов — строчными. В табл. 5 даны примеры обозначения различных мутаций с использованием как аминокислотной, так и нуклеотидной нумерации. Нуклеотидная система записи особенно важна для обозначения делеций, инсерций, сплайсинговых мутаций и полиморфизмов, не связанных с заменами аминокислот или происходящими в нетранслируемых частях гена. В случае делеции или инсерции одного или двух нуклеотидов приводится их буквенное обозначение, например, 441delA, 485insTA. При делеции или инсерции трех и более нуклеотидов указывается только их число. Так, 852del22 означает делецию 22 нуклеотидов, начиная с 852-го нуклеотида, а 3320ins7 обозначает вставку 7 пар оснований после нуклеотида 3320. В случае больших вставок или делеций их размеры указываются в тысячах пар оснований (т.п.о.) или килобазах (kb), например 2115ins13kb, или обозначаются соответствующие инсертированные/делетированные структурные элементы генома. Так, 2115insAlu означает инсерцию Alu-повтора после нуклеотида 2115. При обозначении сплайсинговых мутаций записывают номер крайнего нуклеотида в ближайшем к мутации экзоне, число нуклеотидов (со знаком «+» в случае 3'-конца экзона и со знаком «-» в случае 5'-конца) и характер нуклеотидной замены (рис. 8, табл. 5). Например, запись 711 + 5G → T обозначает замену G на T в 5-м положении интрона, следующего за экзоном, заканчивающимся 711-м нуклеотидом.

В 1998 г. был предложен несколько модифицированный вариант записи мутаций [Antonarakis, 1998], который пока не получил официального статуса, но уже

Таблица 5

Обозначения мутаций (на примере гена *CFTR*)

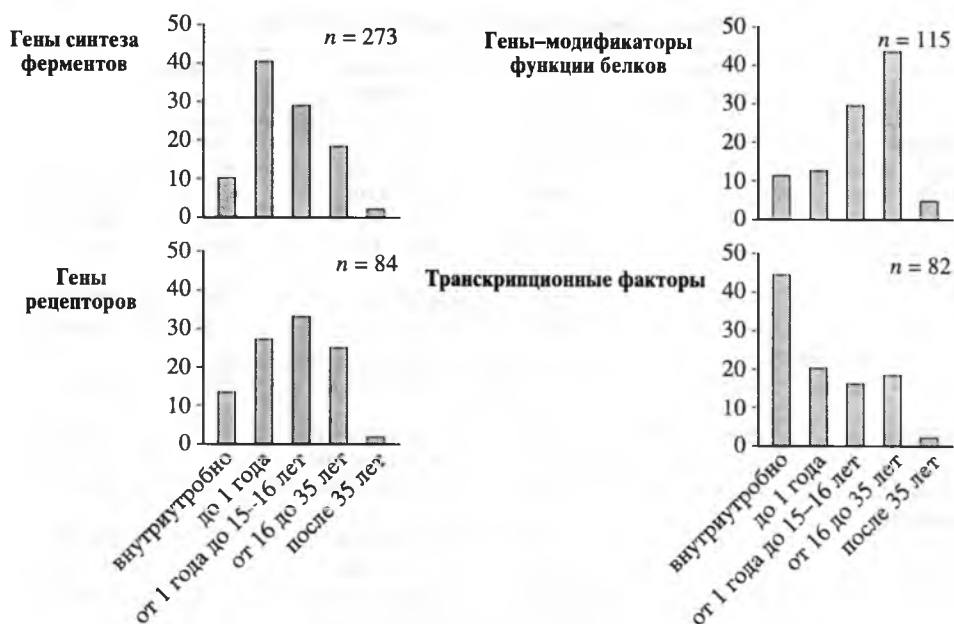
Название	Изменение нуклеотидов	Позиция	Изменение аминокислот	Позиция	Положение
<b>Миссенс</b>					
D44G	A→O	263	Asp→Gly	44	Экзон 2
A455E	C→A	1496	Ala→Gill	455	Экзон 9
S549R(A→C)	A→C	1777	Ser→Arg	549	Экзон 11
S549R(T→G)	T→G	1779	Ser→Arg	549	Экзон 11
<b>Нонсенс</b>					
Q39X	C→T	247	Gin→Stop	39	Экзон 2
W1282X	G→A	3978	Trp→Stop	1282	Экзон 20
<b>Вставка, делеция</b>					
del F508	Делеция 3 п.н.	1652–1655	Делеция F	508	Экзон 10
241delAT	Делеция AT	241	Сдвиг рамки		Экзон 2
852del122	Делеция 22 п.н.	852	Сдвиг рамки		Экзон 6а
I 154insTC	Вставка TC	1154	Сдвиг рамки		Экзон 7
<b>Сплайсинг</b>					
621+IG→T	G→T	621+1	5'-сигнал		Интрон 4
622→2A→C	A→C	622-2	3'-сигнал		Интрон 4
3849+10kbC→T	C→T	10 kb экзон 19	Ошибочный сплайсинг		Интрон 19
<b>Полиморфизм</b>					
M/V470	A или O	1540	M или G	470	Экзон 10
1716G/A	G или A	1716	Без изменений	528	Экзон 10
125G/C	O или C	125	5'-нетранслируемая область		

используется некоторыми авторами. Рекомендации по дальнейшей унификации системы записи сложных мутаций (дупликации, делеции, инверсии и пр.) недавно разработаны Т. Дунненом (Нидерланды) и Ст. Антонаракисом (Швейцария) [den Dunnen, Antonarakis, 2000].

## 2.4. МУТАЦИИ И НАСЛЕДСТВЕННЫЕ БОЛЕЗНИ

Большинство известных мутаций оказывают повреждающий эффект и являются причинами разнообразных наследственных болезней. При этом патологическое действие мутаций различных генов реализуется на разных стадиях развития. Это положение хорошо иллюстрируют проведенные недавно исследования почти на 1000 различных генах (рис. 9) [Jimenez-Sanchez et al., 2001]. Оказалось, что мутации, затрагивающие гены, кодирующие различные ферменты, реализуются в виде заболеваний в течение первого года жизни. Мутации генов, продукты которых модифицируют функцию белков (транспортные белки, белки про-





**Рис. 9.** Зависимость начала заболевания от мутаций различных типов генов

цессинга и пр.), проявляются уже у взрослых индивидуумов. Мутации генов рецепторов чаще всего становятся очевидными в период полового созревания. Любопытно, однако, что мутации генов, кодирующих так называемые транскрипционные факторы — ядерные регуляторные белки, ответственные за регуляцию активности многих генов в период раннего онтогенеза, реализуются преимущественно во внутриутробном периоде, вызывая тяжелые уродства и индуцируя прерывание беременности.

Таким образом, именно гены факторов транскрипции вносят особенно большой вклад в патологию внутриутробного развития человека. Исследование этих генов и путей реализации их мутаций — одно из интересных и пока малоизученных направлений биологии развития человека.

В равной мере весьма ориентировочно можно судить и о том, сколько всего наследственных (моногенных) заболеваний у человека. Исходя из ориентировочного числа генов (около 30 000—35 000) можно было предполагать равное им число моногенных болезней. В действительности, число уже известных наследственных болезней и синдромов составляет только около 3500—4000 (см. табл. 1, № 3). Более того, по мнению ведущих специалистов, существенного увеличения числа нозологий после расшифровки генома человека скорее всего не произойдет [Collins, McKusick, 2001]. Если оно и возрастет, то совсем незначительно, поскольку число метаболических путей, по которым реализуется патологический фенотип, ограничено. Более того, каждый морфогенетический акт, каждая функция обеспечивается скоординированным действием многих десятков и со-

тен генов, так называемых **генных сетей** [Колчанов и др., 2000]. Поэтому весьма сходные патоморфологические и функциональные нарушения могут наблюдаться при мутациях разных генов, что и составляет основу **генетической гетерогенности** наследственных болезней (см. ниже). Дальнейшие исследования в рамках программы «Геном человека», в особенности связанные с функциональной геномикой (протеомикой), дадут новую информацию о том, какие гены или группы генов вовлечены в «генную сеть», определяющую этиологию и патогенез того или иного заболевания, а также — каков вклад отдельных генов в развитие патологического процесса.

Одной из важных характеристик мутаций является **гетерогенность** их фенотипических проявлений: мутации даже одного гена могут вызывать разные наследственные болезни и, наоборот, мутации разных генов могут приводить к весьма сходным или даже клинически идентичным патологическим состояниям [Гайцхоки, 1994; Горбунова, Баранов, 1997]. Генетическая гетерогенность наследственных болезней может иметь разные причины. Прежде всего, мутации в разных генах, нарушая разные звенья одного и того же биохимического цикла (процесса) могут в конечном счете приводить к одному и тому же биохимическому эффекту. С другой стороны, мутации в одном и том же гене могут совершенно по-разному влиять на функции белкового продукта и давать разный продукт в разных тканях и органах (альтернативный сплайсинг). Например, мутации в гене адренорецептора, локализованного на X-хромосоме, могут быть причиной нейродегенеративного заболевания — болезни Кеннеди, если они захватывают область тринуклеотидных повторов, и в то же время приводить к синдрому тестикулярной феминизации (нарушениям половой дифференцировки), если они затрагивают другие участки этого же гена. Мутации гена рецептора тирозинкиназы — *RET*, могут приводить к четырем различным наследственным синдромам, таким как семейная медулярная карцинома щитовидной железы, болезнь Гиршпрунга, множественная эндокринная неоплазия тип 2А (МЭН-2А) и тип 2В (МЭН-2В) [Heueningen, 1994]. Причины такого фенотипического разнообразия могут быть различны и сводятся к следующим:

- локализация мутаций в генах, кодирующих функционально разные домены белка;
- принципиально разный механизм действия мутаций (*loss-of-function*, *gain-of-function*) (см. выше);
- присутствие в том же гене модифицирующего мутантного аллеля или полиморфизма;
- влияние генетического окружения на проявление мутантного аллеля, т.е. его взаимодействие с определенными аллелями гена-модификатора или даже несколькими такими генами.

Хорошо известна и обратная ситуация, т.е. мутации разных генов, зачастую в разных хромосомах, ведут к клинически тождественным или близким по симптоматике заболеваниям.

Так, невральная амиотрофия Шарко—Мари—Тус может вызываться мутациями в генах, локализованных на разных хромосомах; синдром Элерса—Данлоса — мутациями, по крайней мере, в семи различных коллагеновых генах и т.д.

Таким образом, углубленный молекулярно-генетический анализ практически каждого наследственного заболевания выявляет значительную генетическую ге-

терогенность, связанную с различными мутациями гена, а для ряда других заболеваний позволяет подозревать наличие мутаций в разных генах.

## 2.5. ИДЕНТИФИКАЦИЯ МУТАЦИЙ

Важнейшим итогом исследований по изучению генома человека явилась разработка удобных и универсальных методов идентификации мутаций, т.е. определения количественных и качественных изменений первичной структуры молекулы ДНК.

Разработка молекулярных методов обнаружения мутаций основана на следующих основных принципах:

1) комплементарность нуклеотидных оснований — аденин всегда гибридизуется с гуанином, а тимин с цитозином;

2) при нагревании происходит разъединение цепей ДНК (денатурация), т.е. нормальная двухцепочечная спираль ДНК расщепляется на две одноцепочечные;

3) при охлаждении (ренатурации) происходит восстановление двухцепочечной структуры ДНК в соответствии с правилом комплементарности нуклеотидов;

4) можно расщепить молекулу ДНК с помощью ферментов — эндонуклеаз, разрезающих ДНК в местах со строго определенной для каждой эндонуклеазы последовательностью нуклеотидов;

5) в настоящее время известно свыше 500 различных эндонуклеаз, узнающих и разрезающих определенные участки ДНК: для частощепящихся рестриктаз такие фрагменты равны 4–5 п.о.; для редкощепящихся эндонуклеаз они соответствуют 6–8 п.о.;

6) фрагменты ДНК в полиакриламидном или агарозном гелях легко разделяются под действием электрического тока; относительное положение фрагментов ДНК после электрофореза определяется их размерами.

### Основные методы идентификации мутаций

Одним из основных и исторически первым методом идентификации мутаций был метод блот-гибридизации (*Саузерн-блот*), предложенный еще в 1975 г. английским ученым Эдвардом Саузерном. В течение почти 10 лет этот способ оставался единственным надежным методом обнаружения мутаций разных генов. Суть метода состоит в рестрикции геномной ДНК одной или несколькими эндонуклеазами с последующим разделением образовавшихся фрагментов ДНК по их молекулярной массе путем электрофореза в агарозном геле. Затем проводится блоттинг, фрагменты ДНК переносят на плотный носитель (целлюлозный фильтр или нейлоновую мембрану). Фиксированную на фильтрах ДНК гибридизуют с мечеными ДНК-зондами, позволяющими точно определить локализацию и, соответственно, размеры искомого геномного фрагмента ДНК. Необходимость работы с чистыми препаратами ДНК, применение радиоактивно меченых зондов, длительность и трудоемкость процедуры делают ее весьма неудобной и дорогостоящей для практической диагностики. Тем не менее, и в настоя-

шее время различные варианты данного метода все еще находят применение для научных и диагностических целей. Прежде всего, это относится к гибридизации ДНК-зондов с электрофоретически разделенными молекулами РНК (*Нозерн-блот*) или электрофоретически разделенных белков, фиксированных на фильтрах, с мечеными антителами (*Вестерн-блот*).

В настоящее время метод Саузерн-блот применяется для идентификации протяженных мутаций, затрагивающих структуру гена (большие делеции, инсерции, дупликации). При поиске таких мутаций геномную ДНК донора и больного обрабатывают частощепящими рестриктазами (обычно *MspI* или *TaqI*), затем проводят электрофорез, блот-гибридизацию с меченым ДНК-зондом и сравнительный анализ расположения полос на радиоавтографе. Наличие протяженных делеций, инсерции, дупликации, а также точечных мутаций в сайтах рестрикции приводит к изменению размеров рестрикционных фрагментов [Горбунова, Баранов, 1997].

Другим базовым методом ДНК-диагностики, безусловно, является *полимеразная цепная реакция* (ПЦР). Применение ПЦР в течение часа приводит к увеличению в миллионы раз количества заданного фрагмента геномной ДНК и существенно облегчает идентификацию искомой мутации. Метод ПЦР предложен в 1983 г. Кэрри Муллисом, удостоенным за это открытие Нобелевской премии в 1992 г.

Метод ПЦР или специфической амплификации (умножения) ДНК позволяет избирательно синтезировать *in vitro* относительно небольшие фрагменты ДНК длиной от нескольких десятков до нескольких сотен, реже до нескольких тысяч пар оснований. При определенных условиях метод позволяет амплифицировать фрагменты ДНК длиной до нескольких десятков тысяч пар оснований.

Необходимым условием для проведения ПЦР является знание нуклеотидной последовательности участков ДНК, фланкирующих участок амплификации. Такие последовательности (затравки), длиной 20–30 п.о., называются *олигопраймерами*. Они комплементарны по своему нуклеотидному составу 3'-концам амплифицируемого участка на смысловой и антисмысловой нитях ДНК. Соответственно, расстояние между олигопраймерами определяет длину амплифицируемого участка ДНК.

Решающую роль в становлении и широком использовании ПЦР сыграло выделение термофильной ДНК-полимеразы, сохраняющей стабильность в условиях высокой температуры, необходимой для денатурации ДНК.

Принципиальная схема ПЦР показана на рис. 10. Реакция проводится в несколько последовательных этапов, для реализации которых широко используются специальные программируемые аппараты — термоциклеры, позволяющие задавать и поддерживать определенный температурный режим реакции. Все компоненты реакции — матричную ДНК, олигопраймеры, смесь дезоксинуклеотидов и термофильную ДНК-полимеразу добавляют в специальный солевой буфер непосредственно перед помещением пробирки с реакционной смесью в термоциклер.

На первом этапе исследуемая двухнитевая матричная ДНК переводится в одонитевую форму путем ее нагревания в течение нескольких минут до температуры 95–98 °С. Дальнейшая схема заключается в чередовании циклов:

- гибридизация или отжиг ДНК с праймерами;
- синтез участков, комплементарных матричной ДНК;

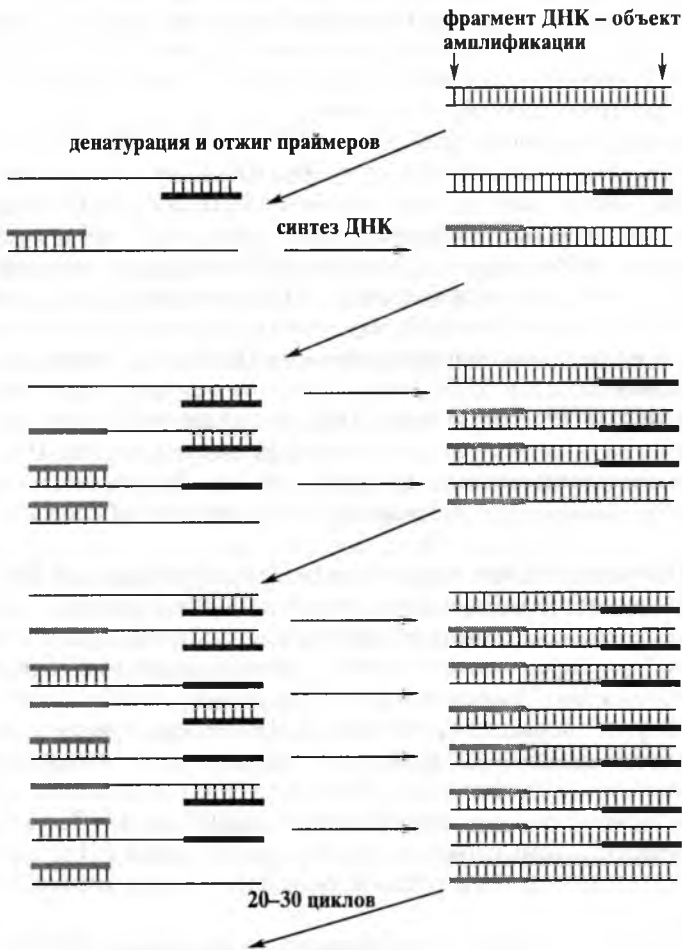


Рис. 10. Принципиальная схема полимеразной цепной реакции (ПЦР)

- денатурация образовавшихся двухнитевых структур.

На этапе гибридизации температура реакционной смеси снижается до  $+30-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Находящиеся в растворе олигопраймеры гибридизуются с денатурированной (одноцепочечной) геномной ДНК, содержащей комплементарные участки.

Повышение температуры до  $+60-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , оптимальной для работы термофильной TaqI ДНК-полимеразы, запускает синтез ДНК в направлении от 5' к 3'-концу геномной ДНК-матрицы.

При дальнейшем повышении температуры до  $+80-90\text{ }^{\circ}\text{C}$  синтез ДНК прекращается, происходит денатурация с освобождением с геномной матрицы уже синтезированных фрагментов ДНК, которые в свою очередь становятся матрицами для синтеза ДНК при последующих циклах амплификации.

Таким образом, в каждом цикле происходит увеличение числа синтезированных копий участка амплификации, причем содержание продуктов амплификации возрастает в геометрической прогрессии. В среднем, один полный цикл денатурация — гибридизация — синтез — денатурация длится одну—три минуты. За 25—30 циклов число синтезированных копий ДНК достигает нескольких миллионов.

Выбор оптимального режима работы определяется длиной и специфичностью амплифицируемого участка.

При помощи ПЦР можно идентифицировать многие мутации, а также изучать полиморфные сайты. Подбор олигопраймеров проводят на основании анализа нуклеотидных последовательностей в участках ДНК, фланкирующих ту или иную мутацию. Разработаны различные варианты автоматического выбора олигопраймеров, оптимальных для получения различных амплификатов.

В ряде случаев, особенно при идентификации разных мутаций в одном гене, проводят одновременную амплификацию нескольких участков матричной ДНК. Такую модификацию метода называют *мультиплексной* ПЦР, которая используется, например, для идентификации мутаций в гене *CFTR* (муковисцидоз), в гене дистрофина (миодистрофия Дюшенна) и других заболеваний.

Анализ результатов ПЦР проводят путем гель-электрофореза продуктов амплификации, которые при необходимости обрабатывают соответствующими эндонуклеазами. В дальнейшем, гели окрашивают красителем бромидом этидия и визуализируют продукты ПЦР (рестрикции) в проходящем ультрафиолетовом свете с длиной волны 380 нм. Кроме того, продукты амплификации можно идентифицировать путем блот-гибридизации со специфическими ДНК-зондами или другими методами окрашивания.

Подробно с техникой постановки ПЦР, ее многочисленными модификациями, а также с методами анализа ДНК, основанными на применении ПЦР, можно ознакомиться в следующих монографиях и методических руководствах [Горбунова, Баранов, 1997; Ивашенко и др., 1999; Горбунова, 1999; Харрингтон, Макги, 1999]. Некоторые из этих методов кратко рассмотрены в следующих разделах данной главы.

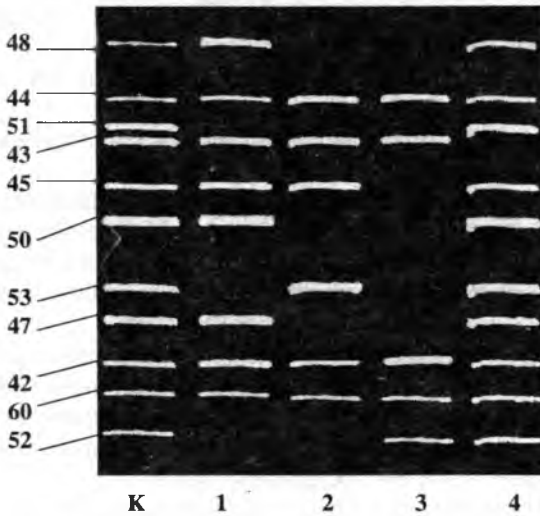
Следует отметить, что ПЦР, безусловно, самый часто используемый молекулярный метод, позволяющий не только идентифицировать многие уже известные мутации, но и лежащий в основе более сложных современных методов изучения генома, в том числе и анализа неизвестных мутаций (см. ниже). При этом методы идентификации мутаций различны и зависят от того, проводится ли детекция уже известных мутаций, или целью исследования является поиск новых мутаций.

## Идентификация невыявленных мутаций

Основные типы мутаций могут быть обнаружены путем прямого секвенирования мутантной кДНК или отдельных экзонов. Зачастую первичный поиск нарушений в кодирующих областях гена проводят именно таким образом. В последние годы разработаны различные модификации метода ПЦР, которые значительно облегчают секвенирование амплифицированных фрагментов и повышают его эффективность.

Наиболее просто идентифицируют мутации, изменяющие длину амплифицированных фрагментов, так как такие нарушения легко выявляются при элект-

## Экзон



**Рис. 11.** Мультиплексная ПЦР образцов ДНК больных миодистрофией Дюшенна (1–4) и здорового донора (К)

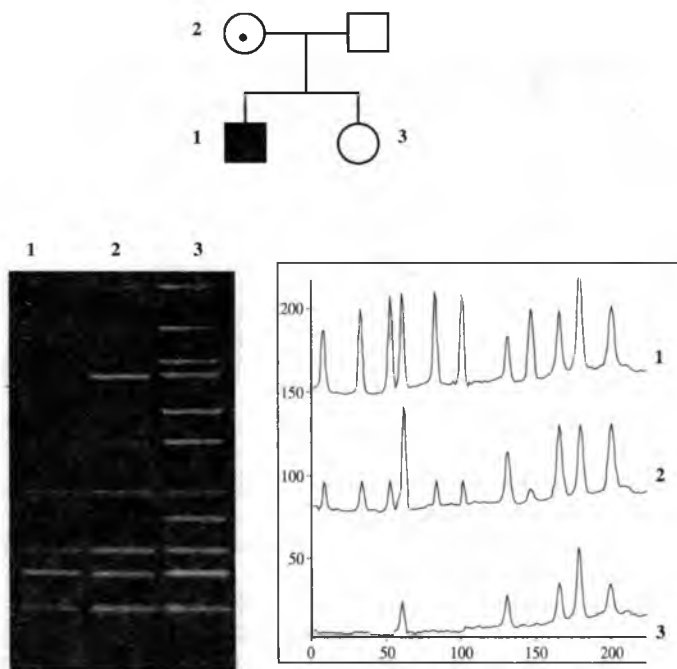
которых приходится около 60% всех мутаций, приводящих к миодистрофии Дюшенна. При отсутствии делеций амплифицированные фрагменты после электрофоретического разделения и окрашивания можно наблюдать в виде отдельных полос. Если в исследуемой ДНК какие-то экзоны делетированы, будут отсутствовать и соответствующие им полосы на электрофореграмме (рис. 11). Выбирая определенные участки гена для амплификации, можно оценить размер делеции с точностью до одного экзона и определить ее локализацию внутри гена.

Этот метод, однако, не обнаруживает подобные делеции в гетерозиготном состоянии, так как гомологичный фрагмент геномной ДНК нормального гена может служить матрицей для амплификации и, таким образом, не позволяет выявить отсутствующий участок гена. Данный подход может быть применен к идентификации делеций в аутосомных генах только при использовании так называемой *количественной* ПЦР с автоматической регистрацией результатов амплификации с помощью специальной видеокамеры, дополненной компьютерной программой обчета денситометрических показателей электрофореграммы (рис. 12).

Другой подход к идентификации подобных делеций у гетерозигот основан на использовании в качестве матрицы для ПЦР кДНК, полученной путем обратной транскрипции мРНК, изолированной из тканей или культур клеток, экспрессирующих данный ген.

Небольшие делеции и вставки единичных нуклеотидов влияют на размеры амплифицированных фрагментов ДНК. Эти изменения могут быть зарегистрированы при электрофорезе продуктов амплификации в агарозном или полиакриламидном геле. Именно этот метод используется для обнаружения наиболее часто встречающейся мутации в гене муковисцидоза — делеции трех нуклеотидов

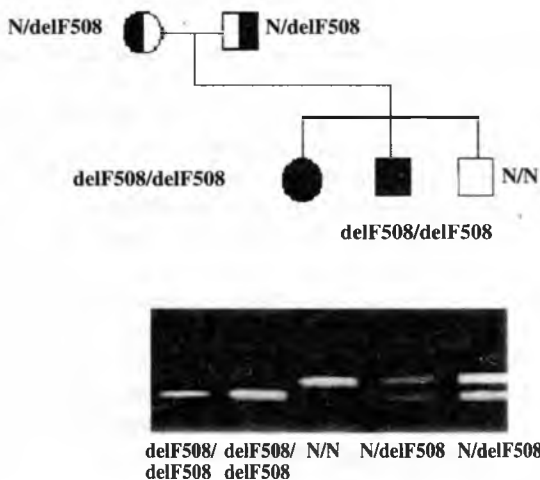
рофоретическом анализе. Протяженные делеции, захватывающие целые экзоны, могут быть выявлены по изменению длины рестрикционных фрагментов методом блот-гибридизации. Для выявления делеций в генах, локализованных на половых хромосомах, разработана более простая и эффективная методика, которая основана на одновременной амплификации различных экзонов, т.е. *мультиплексный вариант* ПЦР. Разница в размерах и количестве амплифицированных фрагментов позволяет легко идентифицировать такие мутации при электрофоретическом разделении продуктов ПЦР. Особенно широко этот метод используется для идентификации делеций в гене дистрофина, на долю ко-



**Рис. 12.** Определение носительства мутации в семье с миодистрофией Дюшенна методом количественной мПЦР

delF508 (рис. 13). После выявления различий между нормальной и мутантной ДНК в длине амплифицированных фрагментов гена необходимо провести секвенирование необычного фрагмента для определения изменений в первичной структуре мутантной ДНК.

При мутациях гена, представляющих собой замену одного или нескольких нуклеотидов, длины амплифицированных фрагментов остаются постоянными, однако, некоторые физико-химические свойства мутантных молекул ДНК меняются. С учетом этих особенностей разработаны различные варианты поиска мутантных фрагментов ДНК и идентификации в них точечных мутаций. Ведущими из них являются:



**Рис. 13.** Анализ мутаций delF508 в семье К.



Таблица 6

## Преимущества и недостатки различных методов обнаружения мутаций

Название метода	Размер исследуемого участка ДНК, п.о.	Чувствительность метода	Локализация	Токсичность реагентов	Сканирование экзонов	Сканирование мРНК
SSCP	250	80%	Нет	Нет	+++	+
DGGE	600	95%	Нет	Формамид	++	++
CMC	1700	>95%	Да	Да	+	+++
PCR DS	500	>95%	Да	Нет	++	++
HA	300	80	Нет	Нет	++	+

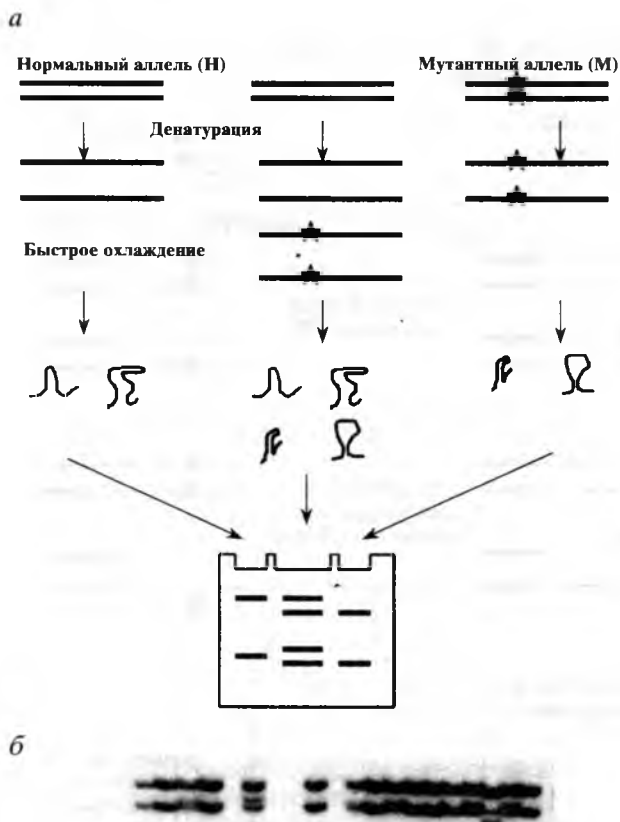
- 1) метод анализа конформационного полиморфизма однострессовой ДНК (SSCP);
- 2) денатурирующий градиентный гель-электрофорез (DGGE);
- 3) метод гетеродуплексного анализа (HA);
- 4) метод химического расщепления некомплементарных сайтов (CMC) (основные характеристики этих методов приведены в табл. 6);
- 5) метод тестирования неполноценного белка (РТТ).

Выявление мутаций этими методами должно обязательно подтверждаться результатами прямого секвенирования изучаемого ДНК-фрагмента гена. Таким образом, все перечисленные выше методы позволяют выявить только подозрительные на наличие точечных и других мутаций участки ДНК, но только метод секвенирования дает полную информацию о типе и характере нуклеотидных изменений.

**SSCP (single strand conformation polymorphism) – метод анализа конформационного полиморфизма однострессовой ДНК**, предложенный М. Orita с соавт. [Orita et al., 1989; Glavac, Dean, 1993], основан на регистрации различий в электрофоретической подвижности однострессовых фрагментов ДНК, одинаковых по величине, но различающихся вследствие нуклеотидных замен по пространственной организации молекул (рис. 14). Скручивание (конформация) небольших однострессовых участков ДНК существенно зависит от их нуклеотидной последовательности, поэтому замена даже одного основания в молекулах одинакового размера приводит к изменению их пространственной структуры. Метод включает амплификацию специфических фрагментов ДНК размером от 50 до 300 п.о., денатурацию образовавшихся продуктов ПЦР и высокоразрешающий электрофорез в полиакриламидном геле. Для выявления полос на электрофореграмме, как правило, используют более чувствительные по сравнению с окраской бромидом этидия методы, такие как окрашивание нитратом серебра (Syber Gold) реже используется ПЦР с мечеными дезоксирибонуклеотидами.

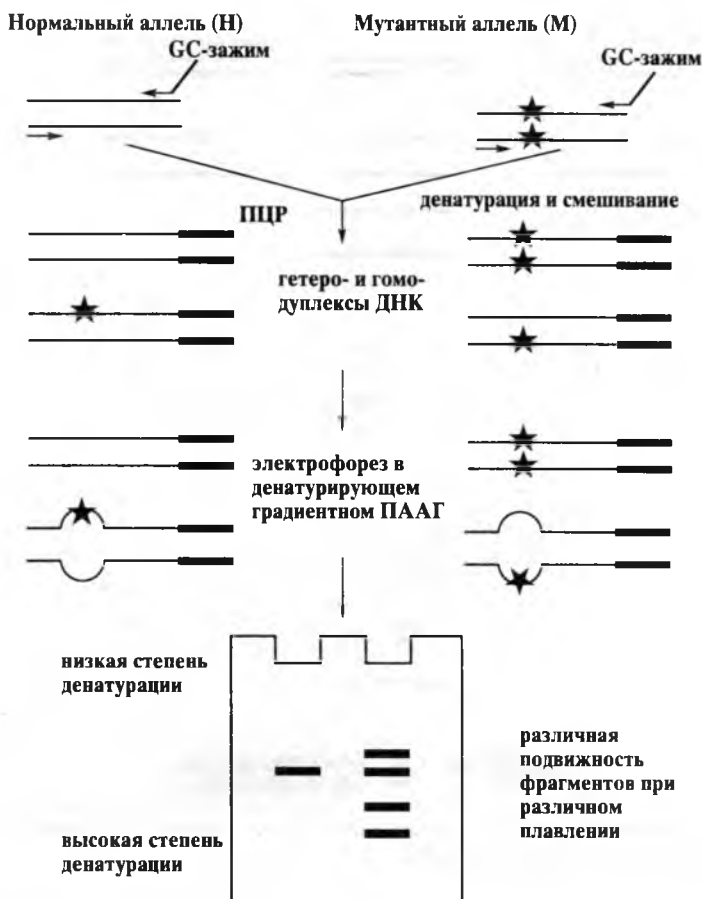
Конформационный метод выявления точечных мутаций быстро получил широкое распространение. Эффективность детекции мутаций при размерах амплифицируемого фрагмента менее 200 п.о. составляет 70–95%, но при длине фрагмента, превышающей 400 п.о., вероятность обнаружения мутаций уменьшается до 50%.

**DGGE (denaturation gradient gel electrophoresis) – метод денатурирующего градиентного гель-электрофореза** основан на зависимости свойств плавления (де-



**Рис. 14.** *а* – принципиальная схема метода SSCP; *б* – пример SSCP-анализа образцов ДНК больных муковисцидозом (экзон 20)

натурации) небольших двухнитевых молекул ДНК от их нуклеотидной последовательности, точнее от соотношения А-Т и G-С пар [Майерс и др., 1990; Fodde, Losekoot, 1994]. Различия в динамике плавления могут быть выявлены путем сравнения подвижности нормальных и мутантных двухнитевых фрагментов ДНК при их электрофорезе в денатурирующих условиях (рис. 15). Различия в денатурации появляются благодаря разнице температур или при создании градиента концентрации мочевины или формальдегида в геле. Одинаковые по величине двухнитевые молекулы ДНК, отличающиеся нуклеотидными последовательностями, денатурируют по-разному [Lerman, Silverstein, 1987]. При электрофорезе амплифицированных двухнитевых фрагментов ДНК в геле с линейно возрастающим градиентом концентраций денатурирующих агентов плавление нитей ДНК происходит в строго специфичной для данного участка области. В результате происходит разделение участков ДНК, различающихся нуклеотидным составом. Таким способом удастся идентифицировать лишь около 50% однонуклеотидных замен во фрагментах ДНК длиной от 50 до нескольких сотен пар нуклеотидов. Эффективность обнаружения мутаций с помощью DGGE метода может быть существенно повышена за счет присоеди-



**Рис. 15.** Принципиальная схема метода DGGE – денатурирующего градиентного гелевого электрофореза

ния к концам амплифицированной ДНК искусственного участка из GC-повторов, длиной в несколько десятков пар оснований, выполняющих роль своеобразных зажимов, наличие которых резко увеличивает шансы обнаружения всех точечных мутаций, независимо от их локализации внутри исследуемого фрагмента ДНК. Метод DGGE пригоден для анализа более крупных фрагментов ДНК, чем при использовании SSCP. При исследовании фрагментов до 600 п.о. эффективность выявления мутаций этим методом достигает 95%. Метод может быть с успехом применен для анализа индуцированных мутаций, так как позволяет улавливать точечные мутации, возникшие даже в одной из 100 обработанных мутагеном клеток. К недостаткам метода следует отнести техническую сложность получения равномерного градиента денатурирующего агента в полиакриламидном геле, а также высокую стоимость искусственно синтезированных GC-концов.

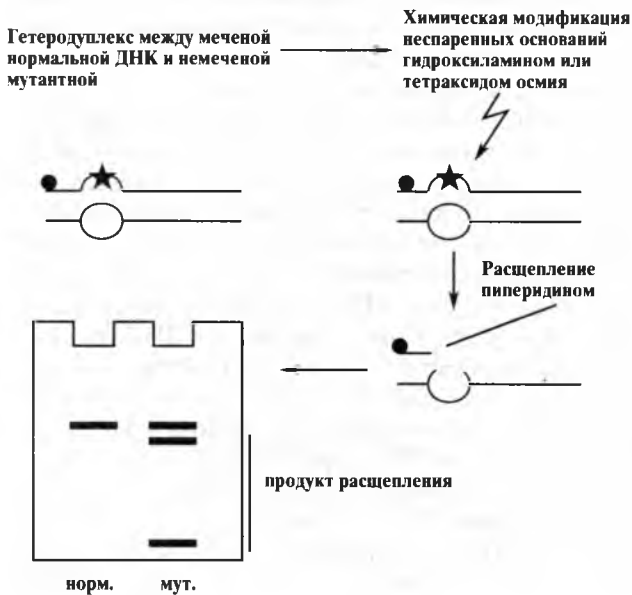
**НА (heteroduplex analysis) – гетеродуплексный анализ** позволяет идентифицировать мутации, находящиеся в гетерозиготном состоянии. Принцип НА-метода заключается в том, что при амплификации относительно небольших фрагментов генов мутация может быть локализована в одной из гомологичных нитей матричной ДНК. Поэтому в амплификационной смеси наряду с двумя типами гомодуплексов (нормальная и мутантная последовательность нуклеотидов) возникают гетеродуплексы между нормальной и мутантной цепочками ДНК. Последние имеют иную электрофоретическую подвижность по сравнению с гомодуплексами (за счет конформационных особенностей в местах несовпадения нуклеотидов (mismatch)) (рис. 16). Эти различия выявляются при электрофорезе в полиакриламидном геле.

Вероятность идентификации точечных мутаций этим способом на фрагментах ДНК менее 300 п.о. достигает 80–90%. Модифицированный вариант метода НА, дополненный конформационно-чувствительным гель-электрофорезом в сочетании с применением флюоресцентных красителей (conformation sensitive polyacrylamide gel electrophoresis based heteroduplex denaturation method (CSGE)) широко используется для поиска мутаций в различных генах и в настоящее время [Edwards et al., 2001].

**СМС (chemical mismatch cleavage) – метод химического расщепления некомплементарных сайтов** основан на способности некоторых химических агентов либо ферментов, специфически разрывать нить ДНК в месте локализации неспаренного основания (рис. 17). Известно, что неспаренный цитозин чувствителен к действию гидроксилamina, а тимин – к тетраоксиду осмия. Последующая обработка пиперидином приводит к полному разрыву молекулы ДНК в модифицированном сайте. Выявление мутаций осуществляют с помощью меченых ДНК-зондов, соответствующих нормальным вариантам ДНК. Такими зондами могут быть синтезированные олигонуклеотиды, клонированные участки ДНК или амплифицированные фрагменты [Cotton, 1990; Cotton, Malcolm, 1991]. При проведении исследования эталонную меченую ДНК смешивают с избытком тестируемой ДНК (или РНК). Тестируемыми образцами ДНК могут служить клонированные ДНК, обработанные соответствующими эндонуклеазами, либо амплифицированные фрагменты. Смесь нагревают до полной денатурации двухнитевых молекул и затем охлаждают, чтобы создать условия для образования дуплексов. При наличии мутаций в тестируемых образцах ДНК в гетеродуплексах, возникших в результате гибридизации между однонитевыми молекулами эталонной и тестируемой ДНК, образуются места негомологичного спаривания. После обработки соответствующими химическими агентами идентификация и локализация мутантных сайтов в исследуемых участках ДНК проводится путем электрофореза и радиоавтографии. Появление укороченных фрагментов ДНК на электрофореграмме свидетельствует о наличии мутантного сайта, а определение размера укороченных фрагментов однозначно определяет локализацию этого сайта в тестируемой молекуле ДНК. Современные модификации метода СМС позволяют идентифицировать до 95–100% мутаций [Grompe, 1993]. Большими преимуществами этого метода являются: возможность исследовать протяженные участки ДНК (до 2 т.п.о.), способность одновременно выявить и локализовать несколько мутаций в одном фрагменте ДНК и возможность одновременно использовать несколько ДНК-зондов для поиска мутаций – мультиплексный вариант



**Рис. 16.** *a* – принципиальная схема метода НА; *б* – пример гетеродуплексного анализа экзона 13 гена *CFTR*



**Рис. 17.** Принцип метода СМС – химического расщепления некомплементарных сайтов

методики. Места точечных мутаций определяются по размерам образовавшихся фрагментов после электрофореза и радиоавтографии. В последние годы широкое применение для идентификации точечных нуклеотидных замен нашел флюоресцентный вариант детекции мутаций с помощью этого метода [Weller, Gartner, 2001].

**РТТ (protein truncated test) – метод тестирования аномального белка.** Основным объектом исследования является функционально (структурно) неполноценный белок – продукт мутантного гена. Вначале выделяют тотальную мРНК из лейкоцитов крови, проводят обратную транскрипцию, амплифицируют специфические экзоны кДНК (*метод RT-PCR*), встраивают амплифицированную область ДНК в экспрессионную бесклеточную систему и анализируют образовавшийся белковый продукт. Метод особенно эффективен при выявлении мутаций в протяженных генах, содержащих большое число экзонов, таких как ген миопатии Дюшенна или ген нейрофиброматоза 1.

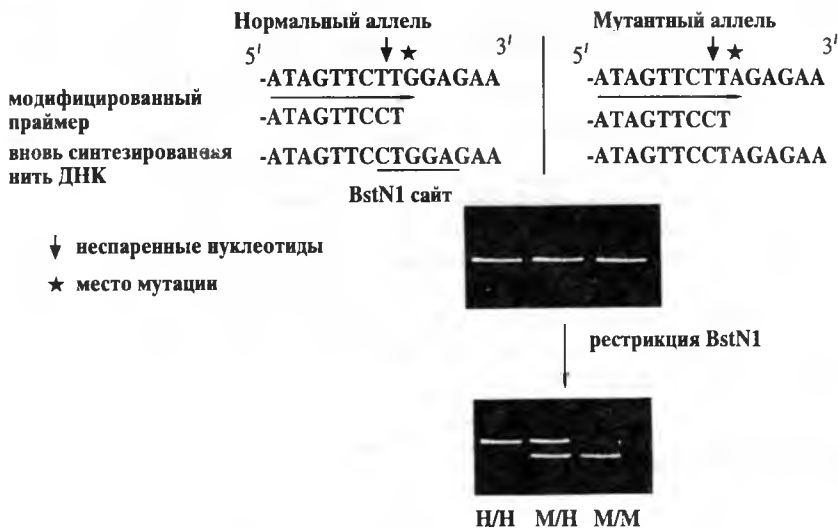
## Идентификация известных мутаций

В настоящее время идентифицированы сотни генов, мутации которых приводят к различным моногенным и мультифакториальным заболеваниям. Для многих из них уже созданы банки данных, отражающие мутационные спектры соответствующих генов (см. табл. 5), идентифицированы мажорные, т.е. наиболее часто встречающиеся мутации, выявлены участки повышенной мутабельности («горячие точки»). Разработаны оптимальные алгоритмы молекулярной диагностики и эффективные методы идентификации уже известных мутаций. Для многих наиболее частых наследственных болезней (муковисцидоз, фенилкетонурия, миодистрофия Дюшенна, серповидно-клеточная анемия и др.) созданы коммерческие наборы, позволяющие выявлять в автоматическом режиме сразу несколько диагностически наиболее важных мутаций.

Из точечных мутаций наиболее просто диагностируются замены нуклеотидов, которые приводят к исчезновению или образованию сайта узнавания какой-нибудь из рестриктаз (эндонуклеаз). Данный тип мутаций выявляется после обработки амплифицированного фрагмента ДНК, содержащего мутацию, соответствующей эндонуклеазой, при этом изменяется количество и молекулярный вес фрагментов ДНК. Поэтому сразу после идентификации мутации проводится компьютерный поиск возможных сайтов рестрикции в месте локализации замены основания. Вероятность такого события довольно велика, так как для каждой из нескольких сотен известных в настоящее время рестрикционных эндонуклеаз сайтом узнавания служит своя специфическая область ДНК, средние размеры которой составляют 5–6 нуклеотидов.

Если естественных рестрикционных сайтов в месте мутации найти не удастся, то такие сайты могут быть созданы искусственно. Ниже приведены некоторые из методов, специально разработанных для выявления некоторых частых мутаций.

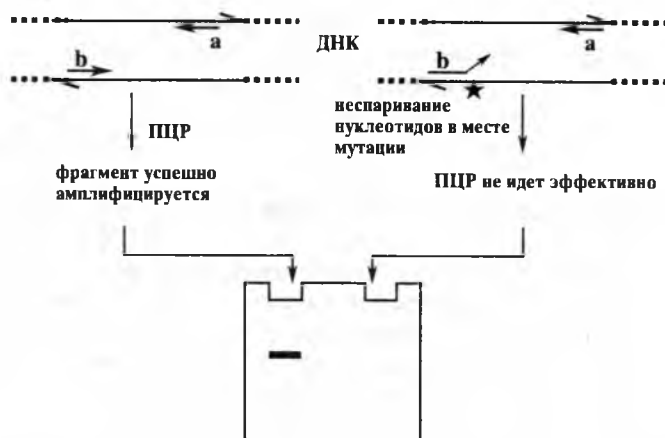
**Метод ПЦР-опосредованного сайт-направленного мутагенеза** [Eiken et al., 1991; Ngo et al., 1991]. Амплифицируемый участок ДНК выбирают таким образом, чтобы 3'-конец одного из праймеров непосредственно примыкал к мутантному сайту (рис. 18). В нем изменяют один из нуклеотидов с 3'-конца так, чтобы в сочета-



**Рис. 18.** Принцип метода ПЦР-опосредованного сайт-направленного мутагенеза. Стратегия определения мутации G542X при муковисцидозе

нии с нуклеотидом мутантного сайта в этом месте образовывался или исчезал сайт рестрикции для какой-нибудь из эндонуклеаз. Таким образом, ПЦР-продукты с нормального и мутантного аллеля отличаются по наличию индуцированного сайта рестрикции. Так, например, если сайт рестрикции индуцирован в мутантном аллеле, то после обработки амплификата соответствующей эндонуклеазой и электрофореза продуктов рестрикции, у индивидуумов, ДНК которых не содержит данную мутацию, на электрофореграмме будет присутствовать один фрагмент, а у гетерозигот появятся два дополнительных фрагмента, соответствующих по длине рестрицированным участкам ДНК, и у гомозигот по мутации будут присутствовать только эти два фрагмента.

Концептуально близким к этому варианту является метод «амплификации рефрактерной мутационной системы» — amplification refractory mutation system — ARMS [Newton et al., 1989; Vottema et al., 1990]. Суть метода заключается в параллельной постановке двух ПЦР, для каждой из которых одним из праймеров служит аллель-специфическая мутантная или нормальная олигонуклеотидная последовательность, соответственно (рис. 19). При этом в качестве второго праймера в двух реакциях выбирают одну и ту же олигонуклеотидную последовательность, так что в обоих случаях могут амплифицироваться участки ДНК одинаковой протяженности. При наличии мутации в исследуемой ДНК амплифицированные фрагменты образуются только в том случае, если в качестве аллель-специфического праймера выбирается мутантная последовательность, тогда как при использовании нормального олигонуклеотидного праймера ПЦР блокируется. Метод нашел широкое применение для обнаружения мутаций при фенилкетонурии, бета-талассемии, муковисцидозе, при типировании генов HLA сис-



**Рис. 19.** Принцип метода ARMS – амплификации рефракторной мутационной системы

Однако сложности в подборе праймеров и выборе оптимального режима ПЦР ограничивают его широкое использование. Несомненным преимуществом метода является возможность применения полностью автоматического сканирования.

Таким же преимуществом обладают и методы выявления мутаций, основанные на лигировании синтетических олигонуклеотидных зондов – OLA (oligonucleotide ligation assay) [Landegren, 1993]. ДНК-зонды для лигирования подбирают таким образом, чтобы они были полностью комплементарны нормальному фрагменту ДНК в области локализации мутации, причем сама нуклеотидная замена должна находиться на стыке двух праймеров. После гибридизации синтезированные олигонуклеотидные последовательности сшивают ДНК-лигазами, выделенными из термофильных микроорганизмов. При наличии мутации в тестируемой молекуле ДНК на конце одного из зондов образуется сайт некомплементарного спаривания, непосредственно примыкающий к месту лигирования. Сшивки между зондами в этом случае не происходит. Метод включает несколько последовательных циклов гибридизации, лигирования и денатурации. В дальнейшем проводят электрофоретический анализ меченых одностранных фрагментов ДНК. Система была успешно использована при тестировании мутаций генов при серповидно-клеточной анемии и мутации *delF508* при муковисцидозе.

Универсальным методом обнаружения замен оснований является метод аллель-специфических олигонуклеотидов – ASO, который включает амплификацию фрагментов ДНК и последующую гибридизацию с мечеными аллель-специфическими олигонуклеотидами [Reiss, 1991]. Для этого синтезируют два типа олигонуклеотидных последовательностей, обычно размером 19 п.о., в которых мутантный сайт занимает центральное положение. Каждый из этих олигонуклеотидных зондов комплементарен нормальному или мутантному вариантам ДНК, соответственно. Условия гибридизации подбирают таким образом, чтобы стабильные дуплексы образовывались только при полной комплементарности гибридных пар. В этих условиях амплифицированные фрагменты ДНК без мутации будут гибри-



дизоваться только с нормальным зондом, ДНК гомозигот по мутации — только с мутантным и ДНК гетерозигот — с обоими маркерными зондами. Разработаны удобные модификации этого метода с использованием аллель-специфических ДНК-зондов, меченных биотином или пероксидазой хрена [Лебедева и др., 1994].

С некоторыми модификациями метод получил широкое распространение для автоматической регистрации наиболее частых мутаций при муковисцидозе, серповидно-клеточной анемии. Система представляет собой ленточный фильтр (стрип) с нанесенными пятнами олигопраймеров, каждый из которых соответствует определенной мутации. Стрип помещают в раствор со смесью меченых амплифицированных фрагментов, которые могут содержать тестируемые мутантные аллели, и создают условия для аллель-специфической гибридизации [Chebab, 1993]. Тот же принцип используется и в ряде новых технологий исследования мутаций и полиморфизмов с помощью чиповой технологии (см. ниже).

В настоящее время происходит быстрое накопление данных о мутациях в различных генах, приводящих к наиболее частым тяжелым наследственным заболеваниям. Для получения информации об уже известных мутациях соответствующих генов и способах их обнаружения созданы специальные базы ДНК данных по отдельным нозологиям. В табл. 7 указаны адреса в Интернете для доступа в банки данных наиболее частых моногенных и некоторых мультифакториальных наследственных болезней.

Для большинства частых моногенных болезней эффективность идентификации мутации у больного индивидуума уже сегодня находится в пределах 90–100% (муковисцидоз, миодистрофия Дюшенна, гемофилия, хорea Гентингтона, синдром ломкой X-хромосомы, фенилкетонурия). В то же время для большинства онкологических и сердечно-сосудистых заболеваний с выраженным генетическим компонентом эффективность детекции мутаций в соответствующих генах колеблется в широких пределах (от 10 до 90%), составляя в среднем около 40% [van Ommen et al., 1999]. В настоящее время по инициативе группы ученых, организовавших и в течение ряда лет издающих научный журнал «Human

Таблица 7

Адреса в Интернете для доступа в банки данных наиболее частых моногенных и некоторых мультифакториальных наследственных болезней

ЗАБОЛЕВАНИЕ	ИНТЕРНЕТ-САЙТ
Муковисцидоз	<a href="http://www.genet.sickkids.on.ca.cfttr/">http://www.genet.sickkids.on.ca.cfttr/</a>
Миодистрофия Дюшенна	<a href="http://www.dmd.nl">http://www.dmd.nl</a>
Гемофилия	<a href="http://europium/mrc.rpms.axc.ulc">http://europium/mrc.rpms.axc.ulc</a>
Поликистоз почек	<a href="http://medoc.gdb.org/pkd">http://medoc.gdb.org/pkd</a>
Рак груди и яичников	<a href="http://www.nhgri.nih.gov/intramural_research/lab_transfer/bic.member/index.htm">http://www.nhgri.nih.gov/intramural_research/lab_transfer/bic.member/index.htm</a>
Семейный полипозный рак толстой кишки	<a href="http://perso.curie.fr/Thierry.Soussi./APC.htm">http://perso.curie.fr/Thierry.Soussi./APC.htm</a>
Наследственный неполипозный рак толстой кишки	<a href="http://www.nfdht.nl/database/mdbchoice.htm">http://www.nfdht.nl/database/mdbchoice.htm</a>
Семейная гиперхолестеринемия	<a href="http://www.ucl.ac.uk/fh/">http://www.ucl.ac.uk/fh/</a>

Mutations» (*Richard Cotton, Haig Kazazian Jr.*), на Международной конференции по программе «Геном человека» в Эдинбурге было официально одобрено создание единой компьютеризированной базы данных мутационных спектров разных генов, предназначенной для накопления, хранения и распространения этих данных. Полная информация по этому вопросу может быть получена в Интернете <http://www.centralmutations.org/>.

## Новые методы обнаружения мутаций и генетических полиморфизмов

**DHPLC** (Denaturation high performance liquid chromatography) метод. Метод DHPLC (денатурирующей жидкостной хроматографии высокого разрешения), предложенный еще в 1995 г. [Oefner, Underbill, 1995], позволяет в течение двух-трех минут определить однонуклеотидные замены, делеции и инсерции в амплификатах размерами до 1,5 т.п.о. При этом чувствительность и специфичность метода составляют около 95% [Xiao, Oefner, 2001; Lin et al., 2001]. Метод представляет собой модифицированный вариант метода гетеродуплексного анализа с последующим автоматическим учетом результатов при помощи жидкостного хроматографа. Согласно методу DHPLC, продукты ПЦР исследуемого фрагмента ДНК подвергаются частичной денатурации в растворе с контрольными образцами того же фрагмента в соотношении 1:1 путем нагревания смеси до +95 °С с последующим медленным охлаждением (ренатурацией). При отсутствии мутаций в изучаемом фрагменте формируется только один тип гомодуплексов, но при наличии мутаций формируются несколько типов гетеродуплексов и гомодуплексов (рис. 20). Возникающие гетеродуплексы значительно менее устойчивы к температурным воздействиям, чем гомодуплексы. Эти отличия и можно уловить с помощью жидкостной хроматографии. Метод позволяет в автоматическом режиме улавливать наличие сайтов неспаривания между опытными и контрольными образцами ДНК. Предварительный подбор оптимальных температур плавления гомо- и гетеродуплексов резко повышает чувствительность по сравнению с SSCP методом (см. выше), методом двумерного сканирования гена (two dimensional gene scanning method) равно как и перед исходным методом гетеродуплексного анализа (см. выше) [Xiao, Oefner, 2001].

Метод DHPLC уже широко применяется для генотипирования путем детекции однонуклеотидных замен (SNP); при первичном анализе мутаций генов-кандидатов; при изучении молекулярных маркеров и мутаций Y-хромосомы; для картирования генов с помощью типирования SNP и EST [Xiao, Oefner, 2001].

**SPR метод.** Этот метод основан на явлении поверхностного плазмонного резонанса (surface plasmon resonance). Данное явление представляет собой квантовый оптико-электронный феномен, возникающий при взаимодействии поляризованного света определенной длины волны с поверхностью металла. SPR технология позволяет детектировать биомолекулы (ДНК) и контролировать процесс связывания между двумя (и более) молекулами в режиме реального времени. Взаимодействие фрагментов ДНК приводит к изменению показателя преломления света в поверхностном слое чувствительного датчика, которое фиксируется как изменение в интенсивности сигнала SPR (рис. 21). Важно отметить, что одна из взаимодействующих молекул должна быть иммобилизована на поверхности чувствительного датчика (sensor chip). Взаимодействие молекул в реаль-



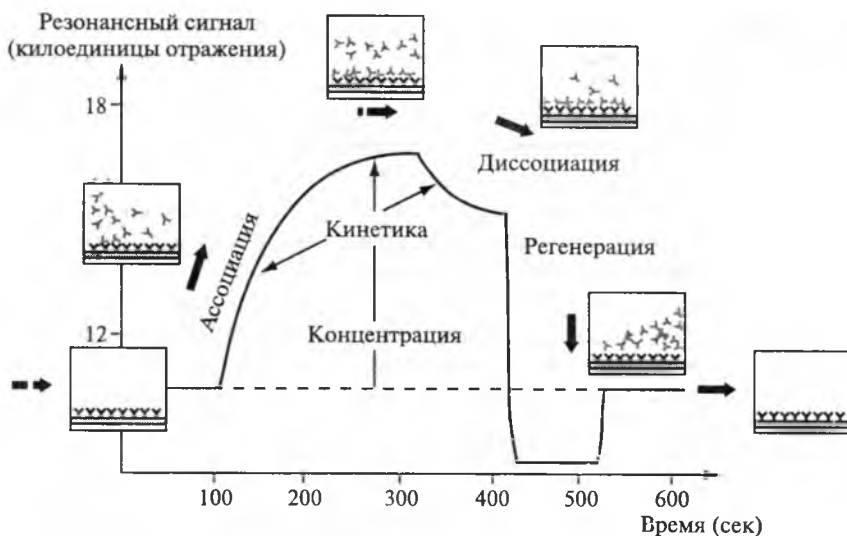


Рис. 22. Схема сенсорограммы

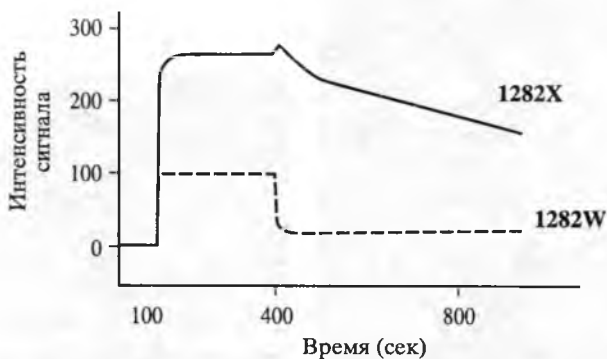


Рис. 23. Пример использования метода SPR для анализа мутаций в гене *CFTR* [Feriotto, et al., 2001]

ном времени отражается на сенсорограмме (рис. 22). Уже в процессе введения образца проба связывается с иммобилизованными на поверхности чувствительного датчика олигонуклеотидами, при этом увеличивается сигнал SPR. В конце введения образца, проба заменяется непрерывной струей буфера, и уменьшение сигнала SPR отражает диссоциацию пробы от поверхностно-связанного комплекса. В зависимости от нуклеотидного состава исследуемой молекулы ДНК характер ассоциации и диссоциации меняется и, соответственно, меняется сенсорограмма (рис. 23).

**Методы ДНК – чипов.** Решающие успехи в идентификации и массовом сканировании однонуклеотидных замен (SNP) связывают с разработкой методов чипов (array based analysis). В обычном варианте чипы представляют собой серию коротких олигонуклеотидных последовательностей (различных по своему составу), зафиксированных на твердой поверхности (стекле), так что на  $1 \text{ см}^2$  поверхности можно разместить до 10 000 таких последовательностей, причем позиция каждого из них четко определена и хорошо идентифицируется в автоматическом режиме.

В настоящее время разработаны и уже используются три типа чипов (microarrays).

1. *Гибридизационные чипы (hybridization arrays).* В основе использования этих чипов лежит принцип аллель-специфической гибридизации. Олигонуклеотидные последовательности, комплементарные двум различным аллелям SNP, фиксируются на твердой поверхности химическими способами. Флуоресцентно-меченный ПЦР-продукт, содержащий SNP, гибридизуется на чипе. В дальнейшем, гибридизационный паттерн визуализируется с помощью микроскопа и анализируется специальными компьютерными программами (рис. 24).

2. *Чипы с фиксацией олигонуклеотидов на агарозной матрице.* В основе этого метода также лежит принцип гибридизации, однако при данном варианте чипов олигонуклеотиды фиксируются на специальной агарозной подложке при помощи электрического тока. Взаимодействие анализируемых проб с олигонуклеотидами происходит под действием электрического поля, которое направляет отри-

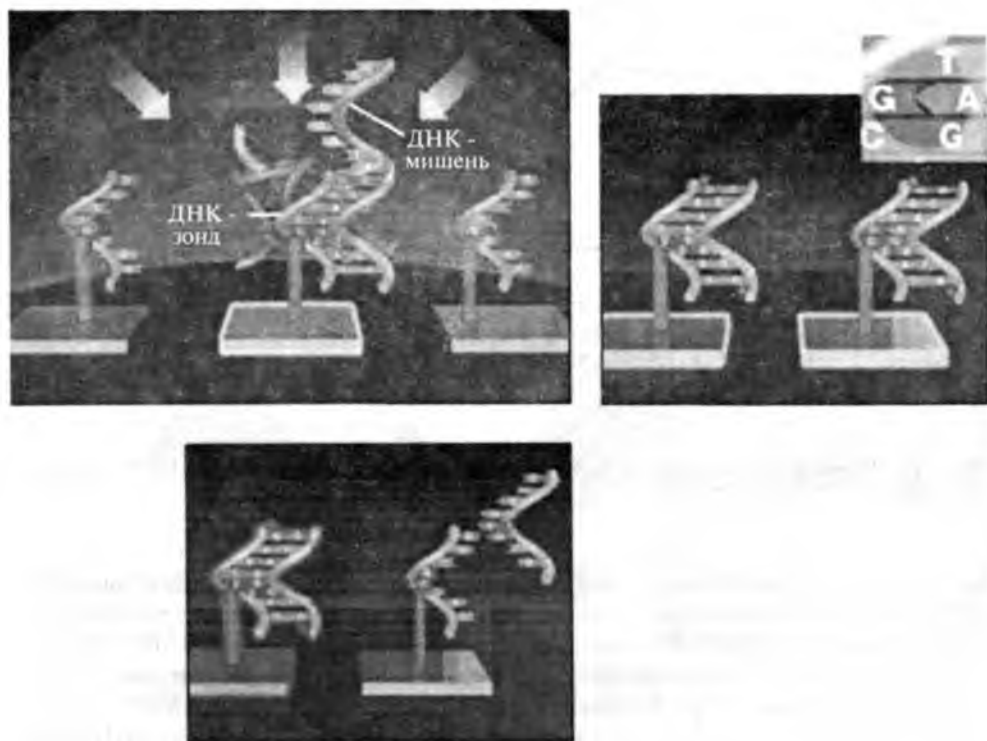
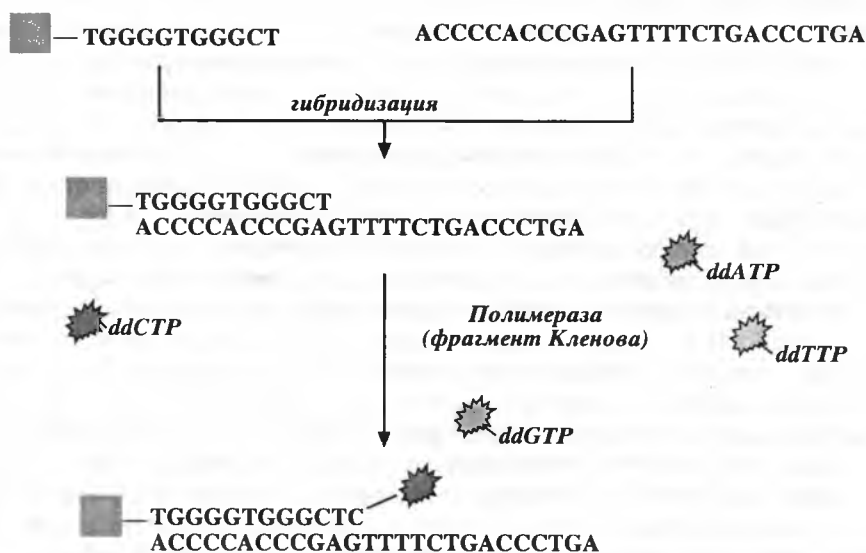


Рис. 24. Принцип использования гибридизационных чипов



**Рис. 25.** Принцип работы чипов с ферментным процессингом (arrayed primer extension (APEX))

цательно заряженные фрагменты ДНК к положительно заряженному чипу с иммобилизованными на нем последовательностями олигонуклеотидов. При этом концентрация исследуемого образца повышается локально в непосредственной близости от чипа, что позволяет повысить скорость гибридизации и сократить время анализа.

3. *Чипы с ферментным процессингом* (arrayed primer extension (APEX)). В отличие от двух предыдущих методов в основе использования этого типа чипов лежит совмещение метода гибридизации и полимеразной реакции. Олигонуклеотиды, соответствующие области ДНК, примыкающей к SNP, фиксируются на чипе. Продукт ПЦР, содержащий SNP, сначала гибридизуют с олигонуклеотидами, а затем проводят реакцию с использованием ДНК-полимеразы и меченных различными флуорохромами дидезоксинуклеотидов. В этой реакции каждый олигонуклеотид, зафиксированный на подложке, становится праймером для полимеразной реакции. Начинается полимеразная реакция и заканчивается присоединением к праймеру единственного меченого дидезоксинуклеотида, соответствующего нуклеотиду в матрице. Цвет флуоресценции свидетельствует о том, какой из четырех нуклеотидов вступил в реакцию с олигопраймером (рис. 25). Таким образом, этот метод не только позволяет быстро улавливать наличие SNP, но и позволяет определить его нуклеотидную природу [Gut, 2001].

Важный вклад в развитие чиповой технологии обнаружения мутаций и однонуклеотидных замен внесли отечественные ученые под руководством академика А.Д. Мирзабекова. В Институте молекулярной биологии им. акад. В.А. Энгельгардта был разработан робот для изготовления исследовательских биочипов. Трехмерный чип изготавливается из полиакриламидного геля и крепится к поверхности стекла в соответствии с технологией БИОЧИП (американский патент —

MAGIChip (Micro-Array of Gel-Immobilized Compounds on a Chip) [Tillib, Mirzabekov, 2001]. Разработанная технология позволяет размещать на одном трехмерном чипе тысячи различных зондов (помимо олигонуклеотидов — РНК, различные белки, клеточные рецепторы, лиганды), автоматически считывать результаты при помощи специального устройства, представляющего собой комбинацию флуоресцентного микроскопа, совмещенного с CCD-камерой, термостатируемым столиком и компьютером с соответствующим программным обеспечением [Fotin et al., 1998; Vasiliskov et al., 1999; Strishkov et al., 2000].

Применение флуоресцентной метки для ДНК-зондов и лазерного сканирования результатов гибридизации меченых зондов с фрагментами исследуемой ДНК существенно повышает эффективность данного метода. В настоящее время уже разработаны и широко применяются биочипы для идентификации точечных мутаций в  $\beta$ -глобиновом гене (диагностика талассемии), генетических полиморфизмов в гене  $\mu$ -опиоидных рецепторов — MOR (диагностика наследственной предрасположенности к наркомании), для быстрой идентификации генов, кодирующих токсины у некоторых патогенных микроорганизмов, и более 30 мутаций гена *rpoB*, определяющих появление антибиотикорезистентных штаммов туберкулезной палочки. Созданы специальные микрочипы для обнаружения хромосомных перестроек при злокачественных болезнях крови.

Существенные сложности в применении биочипов возникают при анализе мутаций в коротких tandemных повторах. Пока эта проблема, к сожалению, остается нерешенной.

Необходимо отметить, что разработана техника, позволяющая проводить ширококомасштабные исследования однонуклеотидных замен (SNP), при этом производство отечественных биочипов значительно экономичней и эффективней продукции коммерческой фирмы *Amphimetrix*, где стоимость только одного чипа однократного применения составляет около 200 долларов.

Нет сомнения в том, что методам чиповой технологии принадлежит будущее, когда поиск мутаций в крупных генах, анализ их мутационных спектров и популяционных паттернов SNP приобретет массовый характер. Уже сейчас чиповая технология используется для поисков мутаций гена *CFTR* (муковисцидоз), генов обратной транскриптазы и протеазы *HIV1*,  $\beta$ -глобинового гена, гена *ATM*, *p53*, *BRCA1* (рак молочной железы) [Nacia et al., 2000].

## Литература

Баранов В.С., Баранова Е.В., Иващенко Т.Э., Асеев М.В. Геном человека и гены «предрасположенности». Введение в предиктивную медицину. СПб.: Интермедика, 2000. 271 с.

Баранов В.С., Горбунова В.Н., Вахарловский В.Г. и др. Наследственные болезни. В кн.: Медицинская лабораторная диагностика (программы и алгоритмы). Ред. А.И. Карпищенко. СПб.: Интермедика, 1997. Т. 3. С. 180–202.

Бочков Н.П. Клиническая генетика. М.: Медицина, 1997. 287 с.

Бочков Н.П., Чеботарев А.Н. Наследственность человека и мутагены окружающей среды. М.: Медицина, 1989. 250 с.

Гайцхоки В.С. Молекулярная генетика человека: достижения, проблемы, перспективы. СПб., 1994. Актовая речь. 25 с.

- Горбунова В.Н., Баранов В.С.* Введение в молекулярную диагностику и генотерапию наследственных заболеваний. СПб.: Специальная литература, 1997. 287 с.
- Горбунова В.Н.* Молекулярные основы медицинской генетики. СПб.: Интермедика, 1999. 213 с.
- Иващенко Т.Э., Асеев М.В., Баранов В.С.* Методы молекулярной диагностики генных болезней. / В кн.: Медицинские лабораторные технологии. Справочник. СПб.: Интермедика, 1999. Т. 2. С. 603–617.
- Иващенко Т.Э., Баранов В.С.* Биохимические и молекулярно-генетические основы патогенеза муковисцидоза. СПб.: Интермедика, 2002. 256 с.
- Иллариошкин С.Н., Иванова-Смоленская И.А., Маркова Е.Д.* Новый механизм мутаций у человека – экспансия тринуклеотидных повторов // Генетика. 1995. Т. 31. С. 1478–1489.
- Колчанов Н.А., Ананько Е.А., Колпаков Ф.А* и др. Генные сети // Мол. биол. 2000. Т. 34. № 4. С. 617–629.
- Лебедева И.В., Ивановская М.Г., Федоров А.Н.* и др. Новый метод нерадиоактивного меченя олигонуклеотидов и использование их в качестве аллельспецифических зондов для выявления мутаций, вызывающих бета-талассемию // Там же. 1994. Т. 28, № 4. С. 796–804.
- Майерс Р., Шеффилд В., Кокс Д.* Обнаружение единичных нуклеотидных замен в ДНК: расщепление РНКазой и денатурирующий градиентный гель-электрофорез. Анализ генома. Методы. М.: Мир, 1990. С. 123–175.
- Мальшиева О.В., Иващенко Т.Э., Баранов В.С.* Популяционный и семейный анализ САG-повторов в гене IT-15 // Генетика. 2001. Т. 37, № 3. С. 402–406.
- Пузырев В.П., Степанов В.А.* Патологическая анатомия генома человека. Новосибирск: Наука, 1997. 223 с.
- Сингер М., Берг П.* Гены и геномы. М.: Мир, 1998. Т. 1. 373 с.
- Фогель Ф., Мотульски А.* Генетика человека. М.: Мир, 1990. Т. 2. 380 с.
- Харрингтон С., Макки Дж.* Молекулярная клиническая диагностика. М.: Мир, 1999. 558 с.
- Antonarakis S.E.* Recommendations for a nomenclature system for human gene mutations. Nomenclature Working Group // Human Mutat. 1998. Vol. 11, № 1. P. 1–3.
- Beudet A.L., Tsui L.-C.* A suggested nomenclature for designing mutations // Там же. 1993. Vol. 2, № 2. P. 245–248.
- Bottema C.D.K., Michels V.V., Fisch R.G., Sommer S.S.* Direct carrier testing for phenylketonuria by PCR amplification of specific alleles. In: Amplifications: A forum for PCR users. 1990. P. 27–29.
- Chebab F.F.* Molecular diagnostics: past, present and future // Hum. Mutat. 1993. Vol. 2, № 5. P. 321–330.
- Collins F.S., McKusick V.A.* Implications of the Human Genome Project for medical science // JAMA. 2001. Vol. 285, № 5. P. 540–544.
- Cotton R.G.H.* Detection of mutations in DNA and RNA by chemical cleavage // Methods in Molecular Biology. 1990. Vol. 7, P. 3–12.
- Cotton R.G.H., Malcolm A.D.B.* Mutation detection // Nature. 1991. Vol. 353, P. 582–583.
- Cotton R.G.H., Scriver C.R.* Proof of “Disease causing” mutations // Hum. Mut. 1998. Vol. 12, P. 1–10.
- den Dunnen J., Antonarakis S.E.* Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutation. A discussion // Ibid. 2000. Vol. 15, № 1. P. 7–12.



Edwards S.M., Kote-Jarai Z., Hamoudi R., Eeles R.A. An improved high throughput heteroduplex mutation detection system for screening BRCA2 mutations – fluorescent mutation detection (FMD) // *Ibid.* 2001. Vol. 17. P. 220–232.

Eiken H.G., Odland E., Boman H. et al. Application of natural and amplification created restriction sites for the diagnosis of PKU mutations // *Nucleic Acids Res.* 1991. Vol. 19, № 7. P. 1427–1430.

Estivill X., Bancells C., Ramos C. et al. The Biomed CF Mutation Analysis Consortium Geographic Distribution and Regional Origin of 272 Cystic Fibrosis Mutations in European Populations // *Hum. Mutat.* 1997. Vol. 10. P. 135–154.

Feriotto G., Corradini R., Sforza S. et al. Peptide nucleic acids and biosensor technology for real-time detection of the cystic fibrosis W1282X mutation by surface plasmon resonance // *Lab. Invest.* 2001. Vol. 81, № 10. P. 1415–1427.

Fodde R., Losekoot M. Mutation detection by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) // *Hum. Mutat.* 1994. Vol. 3, № 2. P. 83–94.

Fotin A.V., Drobyshv A.L., Proudnikov D.Y. et al. Parallel thermodynamic analysis of duplexes on oligodeoxyribonucleotide microchips // *Nucleic Acids Res.* 1998. Vol. 26, № 6. P. 1515–1521.

Glavac D., Dean M. Optimization of the single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations // *Hum. Mutat.* 1993. Vol. 2, № 5. P. 404–414.

Grompe M. The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids // *Nature Genet.* 1993. Vol. 5. P. 111–116.

Gut I.G. Automation in genotyping of single nucleotide polymorphisms // *Hum. Mutat.* 2001. Vol. 17. P. 475–492.

Hacia J.J., Edgemon K., Fang N. et al. Oligonucleotide microarray based detection of repetitive sequence changes // *Ibid.* 2000. Vol. 16, № 4. P. 354–363.

Heyningen V. One gene – four syndrom. // *Nature.* 1994. Vol. 367. P. 319–320.

Jimenez-Sanchez G., Childs B., Valle D. Human disease genes // *Ibid.* 2001. Vol. 409, № 6822. P. 853–855.

Krawczak M., Cooper D.N. Mutational processes in pathology and evolution. In: “Human genome evolution” / Ed. by M. Jackson, T. Strachan, G. Dover // *BIOS Sci. Publ.* 1996. P. 1–34.

Landegren U.N. Ligation-based DNA diagnosis // *BioAssays.* 1993. Vol. 15, № 11. P. 761–765.

Lerman L.S., Silverstein K. Computational simulation of DNA melting and its application to denaturing gradient gel electrophoresis // *Methods Enzymol.* 1987. Vol. 155. P. 482–501.

Lin D., Goldstein J.A., Mhatre A.N. et al. Assessment of denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) in screening for mutations in Connexin 26 (*GJB2*) // *Hum. Mutat.* 2001. Vol. 18. P. 42–51.

Lipkin S.M., Wang V., Stoler D.L. et al. Germline and somatic mutation analysis in the DNA mismatch repair gene *MLH3*: evidence for somatic mutations in colorectal cancers // *Ibid.* 2001. Vol. 17, № 5. P. 389–396.

Newton C.R., Summers C., Schwarz M.J. et al. Amplification refractory mutation system for prenatal diagnosis and carrier assessment in cystic fibrosis // *Lancet.* 1989. Vol. 30. P. 1481–1482.

*Ngo I.S.L., Pace R., Richard M.V.* et al. Methods for analysis of multiple cystic fibrosis mutations // *Hum. Genet.* 1991. Vol. 87. P. 613–617.

*Oefner P.J., Underbill P.A.* Comparative DNA sequencing by denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) // *Am. J. Hum. Genet.* 1995. Vol. 57. A266.

*Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Sekya T.* Detection of polymorphism of human DNA by gel electrophoresis as single cell conformation polymorphism // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1989. Vol. 86. P. 2766–2770.

*Reiss J.* Polymerase chain reaction and its potential role in clinical diagnostics and research // *J. Intern. Med.* 1991. Vol. 230. P. 391–395.

*Strizhkov B.N., Drobyshev A.L., Mikhailovich V.M., Mirzabekov A.D.* PCR amplification on a microarray of gel-immobilized oligonucleotides: detection of bacterial toxin- and drug-resistant genes and their mutations // *Biotechniques.* 2000. Vol. 29, № 4. P. 844–848, 850–852.

*Tillib S.V., Mirzabekov A.D.* Advances in the analysis of DNA sequence variations using oligonucleotide microchip technology // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2001. Vol. 12, № 1. P. 53–58.

*Van Ommen G.J.B., Bakker E., den Dunnen J.T.* The Human Genome Project and the future of diagnostics, treatment and prevention // *Lancet.* 1999. Vol. 354 (suppl.1). P. 5–10.

*Vasiliskov A.V., Timofeev E.N., Surzhikov S.A.* et al. Fabrication of microarray of gel-immobilized compounds on a chip by copolymerization // *Biotechniques.* 1999. Vol. 27, № 3. P. 592–594, 596–598.

*Weller S., Gartner U.* Genetic and clinical aspects of X-linked hydrocephalus (L-1 disease): mutations in L1CAM gene // *Hum. Mutat.* 2001. Vol. 18. P. 1–12.

*Xiao W., Oefner P.J.* Denaturing high-performance liquid chromatography: a review // *Ibid.* 2001. Vol. 17. P. 439–474.

*Xuemin L., Scaringe W.A., Hill K.A.* et al. Frequency of recent Retrotransposition Events in the Human Factor IX Gene // *Ibid.* 2001. Vol. 17. P. 511–551.

# Молекулярные основы наследственных заболеваний

## 3.1. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ НАИБОЛЕЕ ЧАСТЫХ МОНОГЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

*В.С. Баранов, Т.Э. Иващенко, М.В. Асеев*

Согласно черновому варианту расшифрованного генома человека, общее число генов оценивается величиной порядка 35 000—37 000 (см. Введение). Уже известны примерно 22 000 генов, т. е. их присутствие доказано различными методами, в том числе и с помощью гибридационного анализа экспрессионных библиотек генов (EST). Практически неизвестными остаются еще около 15 000 генов, о наличии которых свидетельствуют результаты сравнительного компьютерного анализа первичных последовательностей ДНК.

Непосредственно на хромосомах человека к настоящему времени картировано около 11 000 генов (в среднем, по 300—400 генов на каждой хромосоме). Наибольшее число генов обнаружено на хромосоме 1 (2968), наименьшее (231) — на Y-хромосоме. Наиболее точная информация о числе генов имеется для хромосом 21 (224 гена) и 22 (525). Эти сведения хорошо согласуются с данными дифференциальной окраски этих хромосом: хромосома 21 содержит крупные блоки гетерохроматина, тогда как хромосома 22 имеет преимущественно эухроматиновую природу. Таким образом, области эухроматина, богатые CG парами оснований и соответствующие Гимза-отрицательным R-бэндам, наиболее плотно насыщены генами. Дисбаланс именно этих районов особенно часто является летальным. Напротив, плотность генов в AT обогатенных гетерохроматиновых районах хромосом минимальна. Действительно, дисбаланс более гетерохроматизированной и содержащей сравнительно мало генов хромосомы 21 вполне совместим с постнатальным развитием, хотя и приводит к тяжелой патологии — синдрому Дауна. Для сравнения трисомия такой же по размеру эухроматичной и несущей вдвое больше генов хромосомы 22 не совместима с живорождением и проявляется как доминантная леталь.

Учитывая появление такого большого числа ранее неизвестных генов, логично предполагать, что число наследственных болезней у человека также будет увеличиваться, однако — это не так. В настоящее время число известных нозологий наследственной природы у человека сравнительно невелико и составляет около 3500—4000. При этом, согласно мнению известных специалистов по медицинской генетике, число наследственных заболеваний у человека вряд ли будет существенно возрастать [Фогель, Мотульский, 1989; Бочков, 1997; Collins, McKusick, 2001; Гинтер, 2001]. Такому парадоксу есть несколько объяснений:

1. Мутации многих генов, равно как и подавляющее большинство хромосомных aberrаций, связанных с утратой (моносомии, делеции) или избытком (трисомии, дупликация) генетического материала, могут проявляться еще в антенатальном, точнее в раннем постимплантационном периоде развития, и быть причиной бласто- и эмбриопатий, материал которых сравнительно редко попадает в руки исследователей.

2. Число метаболических процессов на клеточном и межклеточном (тканевом) уровнях, равно как и число основных функций органов и систем организма, ограничено. Их нормальное становление, реакции адаптации и гомеостаза контролируются не одним, а многими десятками и сотнями различных генов, так называемыми *генными ансамблями* или *генными сетями* [Колчанов и др., 2000]. Поломки (мутации) в отдельных звеньях (генах) соответствующей генной сети реально будут приводить к нарушению одного и того же процесса морфогенеза у плода или к нарушению одной и той же функции или метаболического процесса во взрослом организме. Соответственно, конечный результат (аномалии морфогенеза и генные болезни) при мутациях разных генов в одной и той же генной сети могут быть весьма сходными или даже одинаковыми. Это — хорошо известный в эмбриологии и тератологии принцип эквивиальности: одинаковая аномалия при действии разных тератогенов на одной и той же или даже разных стадиях эмбриогенеза [Светлов, 1978].

3. Наконец, важным следствием из второго положения является представление о том, что при отсутствии корреляции между числом генов у человека и числом моногенных болезней, дальнейшая расшифровка генома человека и выяснение функций отдельных генов приведет к существенному расширению наших знаний о генетической гетерогенности наследственных заболеваний [Гайцхоки, 1994]. Действительно, в силу многих причин, проявляющихся уже на уровне функционирующего генома, каждое моногенное заболевание может оказаться весьма гетерогенным.

Рассмотрим подробнее причины несоответствия числа генов в геноме человека реальному числу наследственных заболеваний.

## Зависимость проявления наследственной патологии от возраста

В специальном номере ведущего международного научного журнала "Nature", целиком посвященном «черновому» варианту генома человека, помещена обзорная статья, в которой суммированы данные о времени проявления в онтогенезе человека почти 1000 уже известных патологических, т.е. мутантных, генов [Jimenez-Sanches et al., 2001]. Согласно полученным данным, наибольшее число (33%) моногенных болезней обусловлено мутациями в генах, определяющих синтез различных ферментов (см. рис. 7). Зачастую, это так называемые белки специальных функций или белки терминальной дифференцировки. Примечательно, что мутации таких генов обычно проявляются в первые годы жизни, хотя некоторые из них становятся заметными уже в раннем неонатальном периоде, а другие — только в раннем подростковом возрасте. В единичных случаях мутации проявляются сравнительно поздно, уже у взрослых. К таким поздно манифестирующим моногенным наследственным болезням, прежде всего, следует отнести группу нейродегенеративных заболеваний, так называемых болезней экспансии, обусловленных динамическими мутациями (см. разд. 3.6).

Вторую по частоте группу (15%) составляют гены, обеспечивающие созревание (процессинг), устойчивость и нормальную работу ферментов. К таковым относятся гены белков-транспортеров, белков процессинга, различных рецепторных белков. Мутации этих генов приводят к нарушениям созревания белковых молекул, препятствуют их своевременной и правильной доставке к месту работы. Любопытно, что эти мутации проявляются сравнительно поздно, и пик их манифестации приходится на подростковый возраст.

Несколько неожиданной находкой оказалась третья по численности (10%) группа генов факторов транскрипции (см. рис. 7). Гены этой группы, являясь, как известно, филогенетически очень древними, отвечают за синтез специальных низкомолекулярных ядерных белков, выполняющих важнейшие регуляторные функции, т.е. включающих и контролирующих работу многих других генов. Нередко продукты таких генов являются критическими и способны полностью переключать программы индивидуального развития. Например, продукт регуляторного гена *SRY* уже на ранних стадиях эмбриогенеза (5–7 недель) включает программу, определяющую развитие зародыша по мужскому типу. Гены серии *HOX* отвечают за метамерное строение тела. Они направляют программу дифференцировки позвоночника, ребер и других осевых структур тела. Гены семейства *SOX* регулируют процессы дифференцировки различных отделов мозга и костей лицевого черепа. Любопытно, что мутации таких генов проявляются достаточно рано, как правило, еще в антенатальном периоде и нередко являются причинами тяжелых аномалий развития и ранней эмбриональной гибели (см. рис. 7). Если вспомнить, что почти 2,5% всех новорожденных появляются на свет с тяжелыми анатомическими пороками, причины которых в подавляющем большинстве случаев (около 70%) остаются неизвестными, то кажется вполне логичным, что большинство врожденных пороков неизвестной этиологии имеет в своей основе мутации генов факторов транскрипции. Это интересное предположение пока лишено строгих доказательств, однако, заслуживает самого пристального внимания.

На долю оставшихся генов приходится около 45% всей моногенной патологии (см. рис. 7). Эта достаточно пестрая группа представлена генами, контролирующими синтез рецепторных белков (9%), гормонов (3%), иммуноглобулинов (2%), белков внеклеточного (5%) и внутриклеточного матрикса (5%), белков-переносчиков (5%) и некоторых других. Мутации таких генов могут проявляться на самых разных этапах онтогенеза. Так, для большинства рецепторных белков характерна сравнительно ранняя манифестация с пиком на период полового созревания [Jimenez-Sanches et al., 2001].

Таким образом, почти половина всех известных наследственных болезней обусловлена мутациями генов, определяющих синтез ферментов или продуктов, обеспечивающих сохранность и эффективную работу ферментов. Мутации таких генов приводят к типичным моногенным болезням с пиком манифестации в раннем постнатальном или в подростковом периодах жизни. Мутации генов факторов транскрипции реализуются еще в эмбриогенезе и, по-видимому, играют важную роль в этиологии антенатальной гибели и врожденных пороков развития.

## Генетическая гетерогенность моногенных заболеваний

Клиническая картина одного и того же наследственного заболевания может быть различной у разных больных с той же нозологией и даже у членов одной и

той же семьи [Давиденков, 1964; Бочков, 1997]. Как правило, в основе такой клинической гетерогенности лежит гетерогенность генетическая, причем последняя может быть обусловлена, по крайней мере, тремя факторами: 1) различными мутациями одного и того же гена; 2) мутациями разных генов; 3) влиянием генов-модификаторов.

### *Различные мутации одного гена*

Наиболее обстоятельно этот вопрос изучен в отношении гена *CFTR*, мутации которого приводят к тяжелому наследственному заболеванию — муковисцидозу. Продукт гена *CFTR* — мембранный белок, регулирующий трансмембранный транспорт ионов хлора в эпителиальных клетках. Заболевание характеризуется нарушением функций всех экзокринных желез, особенно легких, поджелудочной железы и кишечника. В настоящее время в гене *CFTR* идентифицировано около 1000 различных мутаций, для многих из которых подробно изучен повреждающий эффект. Согласно существующим данным, повреждающее действие мутаций в гене *CFTR* на молекулярном уровне может проявиться в фенотипе в результате следующих основных процессов:

- возникновения блока синтеза полноразмерного белка за счет нонсенс мутаций (G542X), мутаций сдвига рамки считывания (3905insT), мутаций сплайсинга (621GT);
- нарушения процессинга (созревания) белка на уровне гликозилирования и фосфорилирования (delF508, S549T, A559T, N1303K).
- нарушения функции самого белка *CFTR* (G551D; G551S, G1244E, S1255P, G1349D);
- ограничения трансмембранного переноса ионов хлора (R117H, R334W, R347P).

В случае мутаций первого и второго типов, которые фактически приводят к отсутствию нормального белка *CFTR* в апикальной мембране эпителиальных клеток, тяжесть клинических проявлений заболевания особенно велика, причем всегда отмечается поражение поджелудочной железы. При мутациях третьего и четвертого типов белковый продукт всегда достигает апикальной мембраны и в той или иной мере сохраняет способность к проводимости ионов хлора. У пациентов с этим типом мутаций клиническая картина, как правило, весьма разнообразна и нередко отсутствуют признаки поражения поджелудочной железы. Последнее особенно характерно для всех мутаций, затрагивающих мембранную часть муковисцидозного белка.

Поскольку муковисцидоз является аутосомно-рецессивным заболеванием, у пациентов, несущих в компаунде разные типы мутаций (1 и 3; 2 и 4 или прочие комбинации) наблюдается умеренная форма муковисцидоза без признаков поражения поджелудочной железы. Любопытно, что при определенных сочетаниях мутаций в гене *CFTR* основным, а зачастую единственным фенотипическим проявлением, является нарушение сперматогенеза — синдром CBAVD (congenital bilateral absence of vas deference). При этом двустороннее недоразвитие семявыносящих протоков является причиной азооспермии. Обычно у таких больных при молекулярном анализе обнаруживается какая-то серьезная мутация гена *CFTR* в сочетании со сравнительно слабыми мутациями с неполной пенетрант-

ностью, такими как 5T аллель политимидинового тракта интрона 8, M470V, R117H и другие.

Существующие представления о взаимосвязи генотипа и фенотипа при муковисцидозе недавно получили дальнейшее развитие в обширном, обобщающем популяционном исследовании, проведенном во Франции [Clausters et al., 2000]. В 15-ти различных диагностических лабораториях в общей сложности проанализировано 7420 мутантных аллелей, при этом выявляемость мутаций составила 93,6%. Всего было зарегистрировано 310 различных мутаций гена *CFTR*. Из 800 больных с синдромом СВАВД у 47,6% пациентов зарегистрированы 153 различные мутации. Установлено, что у 87,7% больных с тяжелой формой муковисцидоза в геноме присутствуют либо две серьезные (тип 1 или 2) мутации, либо одна серьезная и одна средняя (типы 1, 2, 3). Для больных с СВАВД в 87,9% были характерны два варианта генотипов: сочетание одной серьезной и одной средней мутации, либо серьезной и легкой (вариабельной) мутации (тип 4), и у остальных (12,1%) были две средние или сочетание средней и легкой (вариабельной).

Таким образом, клинические проявления мутаций гена *CFTR* существенно зависят от природы самой мутации, точнее от того, как она проявляется в белковом продукте и в какой мере влияет на его функциональную активность.

Естественно, закономерности, выявленные в отношении гена *CFTR*, вполне справедливы и для всех других генов. Примеры такого варианта генетической гетерогенности хорошо известны для большинства наследственных болезней. Подробно они исследованы в отношении генов дистрофина (миодистрофия Дюшенна), фенилаланингидроксилазы (фенилкетонурия) и многих других.

Так, мутации в одном и том же гене дистрофина, в зависимости от того, как они влияют на синтез этого присарколемного белка, могут либо приводить к тяжелым формам миодистрофии Дюшенна, либо к более мягким и вяло текущим формам миодистрофии Беккера.

Известны, например, некоторые формы гемофилии В, характеризующиеся тяжелыми клиническими проявлениями в детском возрасте (геморрагический синдром и снижение содержания фактора IX свертывания крови в кровотоке до уровня менее 1% нормальной величины) с последующим смягчением клинической картины в период полового созревания и повышением концентрации фактора IX до 60% от нормы. Мутация была картирована в промоторной области гена фактора IX (положение — 20 от старта транскрипции) при сохранении нормальной структуры цис-регуляторного элемента, вовлеченного во взаимодействие с андрогенами (-22/-36). Клиническое выздоровление при данной мутации связано с тем, что появление мужских половых гормонов и их рецепторов в период полового созревания имеет следствием функциональную активацию промотора гена фактора IX, частично компенсирующую эффект промоторной мутации. При других мутациях промоторной области этого гена (G → C в положении — 26), изменяющих консервативную структуру элемента реакции на андрогены, недостаточность фактора IX носит перманентный характер и не компенсируется в период полового созревания [Гайцхоки, 1994].

По крайней мере четыре заболевания: семейная медуллярная карцинома, щитовидной железы, болезнь Гиршпрунга, множественная эндокринная неоплазия тип 2А (МЭН-2А) и тип 2В (МЭН-2В), могут быть результатом разных мутаций в одном и том же гене тирозинкиназы — гене *RET* [Heyningen, 1994].

Другим крайним проявлением клинической гетерогенности может служить ген андрогенового рецептора, мутации в котором приводят к различным заболеваниям. Увеличение числа повторов в экзоне 1 этого гена приводит к нейродегенеративному заболеванию — болезни Кеннеди, а мутации в ДНК-связывающем или андроген-связывающем доменах — к синдрому тестикулярной феминизации.

Некоторые варианты клинического полиморфизма могут быть связаны с другими мутациями в том же гене, подавляющими или модифицирующими эффект основной мутацией таким образом, что происходит супрессия мутантного аллеля на уровне транскрипции или трансляции белкового продукта и, как следствие, частичное или полное восстановление образования нормального продукта. Особенно часто такие случаи отмечаются в отношении нонсенс-мутаций, приводящих к появлению стоп-кодонов или сдвигу рамки считывания. Примеры таких генетических полиморфизмов, связанных с внутригенной супрессией, известны для гена альфа-1-антитрипсина, одного из генов аполипопротеинов (*ApoB1*) и некоторых других генов [Гайцхоки, 1994]. Необычно легкое течение муковисцидоза ранее было отмечено нами и у пациентки, гомозиготной по мутации delF508, как правило, приводящей к типичной тяжелой форме заболевания. Повидимому, такая супрессия мутации была так же обусловлена наличием дополнительной, корригирующей мутации в гене *CFTR* [Иващенко, 2002].

Таким образом, генетическая гетерогенность даже одного и того же наследственного заболевания, характеризующаяся проявлением его разных клинических форм, зачастую является следствием мутаций одного гена, по-разному влияющих на его экспрессию. В своем крайнем выражении разные типы мутаций одного и того же гена могут быть причиной разных, клинически достаточно удаленных друг от друга заболеваний. Причиной клинической гетерогенности могут быть и другие мутации в том же гене, вызывающие полную или частичную супрессию мутантного аллеля.

### *Мутации разных генов*

Другим проявлением клинической гетерогенности, противоположной по конечному результату рассмотренной выше, может быть появление тождественного или весьма близкого по клинической картине заболевания в случае поражения разных генов. Это означает, что один и тот же биохимический фенотип может быть результатом мутаций в разных генах. Так, болезнь Альцгеймера (старческое слабоумие), характеризующаяся отложением специфического амилоидного белка в мозге, может быть результатом мутаций в гене амилоида (*Ad*) либо в так называемых пресинелиновых генах *PS-1* и *PS-2*. Талассемические синдромы вызываются различными мутациями в альфа- или бета-глобиновых генах. Невральная амиотрофия Шарко—Мари—Тус вызывается мутациями в четырех генах, расположенных на разных хромосомах; синдром Элерса—Данлоса — мутациями по крайней мере семи различных коллагеновых генов как аутомсомной, так и X-сцепленной локализации и т.д.

В ряде случаев детальный клинический осмотр и лабораторные анализы позволяют уточнить, с каким именно геном связано заболевание. Достаточно часто, однако, дифференциальная диагностика возможна только на основании последовательного молекулярного анализа каждого из генов-кандидатов, что безусловно является достаточно трудоемкой задачей.



## Влияние генов-модификаторов

При исследовании наследственных патологий необходимо учитывать не только прямое воздействие первичной генной мутации на биохимические и клинические проявления болезни, но и влияние дополнительных генетических факторов, модифицирующих биохимические проявления мутантного аллеля [Гайцхоки, 1994]. Косвенные или прямые свидетельства наличия генов-модификаторов имеются практически при всех моногенных болезнях. Более того, в свете современной геномики оправдано утверждение некоторых авторов и о том, что как таковые моногенные болезни просто не существуют в силу того, что экспрессия любого гена и, соответственно, действие любого генного продукта зависит и находится во взаимодействии с другими генами и их продуктами. Именно от модификаторов зависит в значительной мере такие показатели генной активности, как широко известные в генетике понятия *пенетрантности* и *экспрессивности*.

Влияние генов-модификаторов на тяжесть течения заболевания наиболее детально исследовано при муковисцидозе. В модельных экспериментах на мышцах с искусственно полученной мутацией гена *CFTR* было установлено, что в зависимости от линии мышей тяжесть заболевания и прежде всего симптомы кишечной непроходимости существенно варьировали [Rozmacher et al., 1996]. Установлено, что локус, определяющий эти различия, находится на хромосоме 7, которая соответствует длинному плечу хромосомы 19 у человека. По-видимому, именно в этом районе (19q13) и находится ген (гены), существенно модифицирующий проявление мутаций в гене *CFTR*. До настоящего времени этот ген не идентифицирован, хотя его активные поиски продолжаются [Иващенко, 2002].

Наши исследования также свидетельствовали о наличии четкой ассоциации некоторых аллелей генов *DQA1* локуса *HLA* с тяжестью муковисцидоза и хронических респираторных заболеваний легких [Бакай и др., 1999].

Достаточно подробно изучена корреляция клинических проявлений муковисцидоза с состоянием генов системы детоксикации. Известно, что основным проявлением муковисцидоза являются тяжелые хронические обтурационные пневмонии, нередко приводящие к смерти. Гены детоксикации отвечают за синтез белков, метаболизирующих и выводящих из организма все ксенобиотики. Мутации этих генов нередко предрасполагают к различным заболеваниям легких: хроническому обтурационному бронхиту, раку легких, эмфиземе, бронхиальной астме и другим [Баранов и др., 2000]. Поэтому можно предположить, что аллельные варианты генов системы детоксикации могут влиять и на клинические проявления мутаций в гене *CFTR* при муковисцидозе. Действительно, наши исследования показали, что больные со смешанной формой и тяжелым течением муковисцидоза чаще являются гомозиготами по «нулевому» аллелю гена глутатионтрансферазы M1 (*GSTM1 0/0*) — фермента второй фазы детоксикации, и чаще характеризуются наличием медленного аллеля (*S*) гена первой фазы детоксикации — микросомальной эпоксидгидролазы (*mEPXH*) [Бакай и др., 1999].

Достоверное преобладание гомозигот *S/S* гена *mEPXH* наблюдается и среди больных с хроническими респираторными заболеваниями. Учитывая достаточно четкую корреляцию легочной патологии с медленным аллелем гена *mEPXH* и нулевым аллелем гена *GSTM1*, есть основание считать, что именно у больных с муковисцидозом, имеющих такой генотип (*mEPXH S/S* и *GSTM1 0/0*), нарушения со

стороны легких могут возникать особенно часто и протекать особенно неблагоприятно. Кажется вполне логичным уже на этом этапе наших знаний генотипировать всех больных с муковисцидозом не только на наличие мутаций в самом гене *CFTR*, но и на носительство неблагоприятных аллелей генов *mEPXH (S/S)* и *GSTM1 (0/0)* с целью объективного прогноза течения заболевания и выработки более рациональной тактики лечения [Бакай и др., 1999].

## Принципы классификации генов наследственных болезней

К настоящему времени на хромосомах человека картировано свыше 11 000 генов (см. гл. 1). Мутации многих из них приводят к различным наследственным заболеваниям. Количество моногенных заболеваний, для которых известна локализация поврежденного гена, приближается к 1000. Однако существуют группы болезней, клинически сильно отличающихся друг от друга, но обусловленных мутациями в одном и том же гене (см. выше).

Более половины картированных генов клонированы и охарактеризованы методами молекулярного анализа. Для каждого из них описаны мутантные варианты, причем количество идентифицированных аллелей в разных генах может колебаться от одного до нескольких сотен. Для ряда онкогенов и антионкогенов, а также для генов наиболее частых тяжелых моногенных болезней созданы специальные банки данных, ко многим из которых разрешен доступ в системе Интернет (см. гл. 2). Данные о спектрах мутаций индивидуальных генов имеют существенное значение как для прямой пренатальной диагностики соответствующих наследственных заболеваний, так и для понимания молекулярных основ их генетической гетерогенности (см. выше).

Особенно большое значение имеет выяснение наиболее частых (мажорных) мутаций, типичных для каждого заболевания, так как можно, ориентируясь именно на такие мутации, подобрать оптимальный алгоритм ДНК-диагностики наследственного заболевания.

В этой связи уместно обратить внимание на особенности мутационных повреждений структурных генов, которые частично были рассмотрены в гл. 2.

Как уже указывалось, несмотря на наличие общих закономерностей мутационных процессов, спектры мутационных повреждений каждого гена уникальны. Причины этой уникальности кроются в особенностях первичной структуры ДНК каждого гена. Таковыми являются:

- 1) обогащенность гена CG-нуклеотидами, предрасполагающая к точечным мутациям типа трансции (замены) цитозина на тимин в процессе метилирования-деметиличивания ДНК;
- 2) размеры гена;
- 3) наличие в его структуре прямых и обращенных повторов;
- 4) присутствие внутри гена ДНК-последовательностей, гомологичных внегенным участкам, что может приводить к нарушениям процессов рекомбинации в мейозе и т.д.;
- 5) инсерции мобильных элементов генома (Alu-последовательности, LINE, SINE);
- 6) динамические мутации, связанные с механизмом экспоненциального роста числа смысловых (транскрибируемых) или нетранскрибируемых триплетных повторов.

Как известно, классификации моногенных наследственных болезней обычно строятся исходя из типов их наследования или из клинических характеристик — т.е. по органо-системному принципу [Бочков, 1997; Бочков и др., 2001].

Однако классификация по клиническим параметрам далеко не всегда может быть проведена однозначно. Во-первых, большое число моногенных наследственных заболеваний носит синдромальный характер и, зачастую, не удается выделить группу ведущих клинических симптомов. Во-вторых, как было отмечено выше, многие болезни отличаются высоким уровнем фенотипической гетерогенности, связанной со спецификой мутационных повреждений, плейотропным (множественным) проявлением действия генов, с особенностями аллельных вариантов генов-модификаторов, различиями в условиях окружающей среды и/или в генетическом фоне. Кроме того, многие болезни, вызванные мутациями в разных генах, могут протекать сходным образом. Поэтому, основываясь только на клинических симптомах, трудно провести дифференциальную диагностику подобных заболеваний. Более объективная классификация моногенных наследственных болезней может быть создана на основании данных о первичном биохимическом дефекте, связанном с мутациями. Ранее нами была уже предпринята попытка классификации моногенных заболеваний, исходя из первичного дефекта продукта гена [Горбунова, Баранов, 1997]. В последние годы, однако, появились многочисленные данные о новых генах и новых моногенных болезнях. При этом для многих из них дефектный белковый продукт еще не идентифицирован, а в других случаях сведения о таком продукте не раскрывают сути молекулярного патогенеза наследственного заболевания. Учитывая геномную направленность всей книги, нам казалось целесообразным изложить материал этой главы, основываясь прежде всего на особенностях спектров мутаций разных генов и, соответственно, на оптимальных алгоритмах ДНК-диагностики различных моногенных болезней.

Исходя из особенностей мутационных спектров и методов ДНК-диагностики, достаточно условно наследственные болезни можно подразделить на следующие основные группы:

1. Болезни, вызванные точечными мутациями, достаточно равномерно распределенными по всей первичной последовательности гена.
2. Болезни, имеющие характерные мажорные мутации, принципиально важные для ДНК-диагностики.
3. Болезни, обусловленные преимущественно протяженными делециями.
4. Болезни, связанные с конверсией генов и наличием псевдогенов.
5. Болезни экспансии, в основе которых лежат динамические мутации.

При этом следует учитывать, что мутационные спектры всех изученных генов включают практически все основные типы генных мутаций (см. гл. 2), однако у большинства больных в указанной группе заболеваний преобладающим и, соответственно, диагностически значимым является определенный тип мутаций.

### *Моногенные болезни, вызванные преимущественно точечными мутациями*

Мутации на уровне нуклеотидов в виде их замен, делеций, дупликаций, инсерций одного или нескольких нуклеотидов — наиболее обширная группа мутационных повреждений, широко представленная практически во всех изученных генах наследственных болезней (см. гл. 2).

Анализ мутационных спектров показывает определенную специфичность, а во многих случаях и уникальность, расположения точечных мутаций по длине гена. Иногда они довольно равномерно распределены по всей первичной последовательности гена, иногда обнаруживают определенную кластерность, т.е. группируются преимущественно в одном или нескольких экзонах. При этом нередко отдельные мутации становятся доминирующими по частоте. В таких случаях они приобретают особенно важное диагностическое значение.

К заболеваниям первой группы можно отнести гемофилии А и В, семейный рак молочной железы и яичников, врожденный поликистоз почек, X-сцепленную гидроцефалию, синдром Смита—Лемли—Опитца, синдром Альпорта. Для молекулярной диагностики этих болезней применяют любые ДНК-методы обнаружения неизвестных мутаций (см. гл. 2). Чаще других используется комбинация методов типа SSCP (однонитового конформационного полиморфизма) — анализа отдельных экзонов с последующим прямым секвенированием фрагментов ДНК, подозрительных на наличие мутаций.

Типичными моногенными болезнями второй группы являются фенилкетонурия, муковисцидоз, ахондроплазия, рецессивная форма глухоты, болезнь Ретта и другие.

Проблемы и оптимальные алгоритмы диагностики этих и других моногенных заболеваний подробно изложены в соответствующих сводках, обзорах и монографиях [Горбунова, Баранов, 1997; Пузырев, Степанов, 1997; Ивашенко и др., 1999; Новиков, Евграфов, 1999; Горбунова и др., 2000; Баранов и др., 2000]. Кратко рассмотрим наиболее типичные из них, диагностируемые в России, а также некоторые новые заболевания, информация о мутационных спектрах которых появилась в последнее время.

### *Болезни без выраженных мажорных мутаций*

**Гемофилия А (OMIM—306700)** — сцепленное с полом заболевание, вызываемое мутациями в гене фактора VIII свертывания крови. Ген *F8C* — один из наиболее крупных генов человека; содержит 26 экзонов размером от 69 до 3106 нуклеотидов. В необычно протяженном (32,4 т.п.н.) интроне 22 гена *F8C* локализовано еще два других структурных гена неизвестной функции — *F8A* и *F8B*, которые экспрессируются во всех тканях. Половина всех больных гемофилией А не имеют фактора VIII, 5% — имеют нормальное количество нефункционирующего белка. В остальных случаях активность белка сохранена, но его количество резко снижено. Изолированные случаи гемофилии А составляют 30%, семейные варианты — 70%. Показано, что мутации в гене *F8C* возникают в сперматогенезе в три—пять раз чаще, чем в оогенезе. Это означает, что в 80—86% спорадических случаев матери являются носителями мутаций, возникших в зародышевых клетках их отцов. Около 14% матерей, не являющихся носителями мутации, могут быть соматическими или гонадными мозаиками. Вероятность повторного рождения больного ребенка у них также повышена.

Подавляющее большинство мутаций, приводящих к гемофилии А, являются точечными. Почти 35% из них локализованы в CpG-динуклеотидах, причем свыше 90% представляют собой C—T или G—A трансзиции. Характерным для мутаций гена *F8C* является практически полное отсутствие «горячих» точек: каждая семья высокого риска гемофилии А имеет свою собственную мутацию.

Исключение составляют только протяженные инверсии интрона 22, захватывающие экзоны 1–22 и полностью блокирующие функцию гена. Такие инверсии регистрируются почти у 45% семей с тяжелой формой гемофилии А. Причиной инверсий в этой области гена является гомологичная рекомбинация между идентичными последовательностями гена *F8A*, расположенного в интроне 22 гена *F8C*, и другими копиями этого же гена, находящимися на расстоянии 500 т.п.н. от 5'-конца гена *F8C*. Доля других мутаций, идентифицированных у больных гемофилией А (делеции, дупликации, инверсии), не превышает 15%. Любопытно отметить, что известны случаи, когда болезнь была следствием инсерционного мутагенеза, вызванного включением в структуру гена *F8C* протяженных транспозоноподобных элементов типа LINE (см. гл. 1).

Для молекулярной диагностики гемофилии А обычно используют косвенные методы. С помощью ПЦР анализируют полиморфные динуклеотидные СА-повторы экзона 13, *Hind* III полиморфизм в интроне 19, *Hba*I полиморфизм в интроне 22 и внегенный полиморфизм локуса *DXS52* (St14/*Taq*I) [Aseev et al., 1994]. Прямая диагностика протяженных инверсий в гене *F8C* осуществляется методом Саузерн-блота после рестрикции геномной ДНК эндонуклеазами *Bcl*I, *Dra*I, *Nco*I и последующей гибридизации с ДНК-зондом p482.6.

**Гемофилия В** (ОМIM–306900) — сцепленное с полом заболевание, вызванное наследственным дефектом фактора IX — важного компонента средней фазы внутреннего каскада свертывания крови. Фактор IX относится к гликопротеинам, состоит из 415 аминокислотных остатков, объединенных в восемь доменов, и синтезируется в виде молекулы-предшественника клетками печени. Его роль в свертывании крови связана с активацией фактора X посредством взаимодействий с ионами кальция, фосфолипидами мембраны и фактором VIII.

Ген характеризуется сравнительно небольшими размерами (около 34 000 п.н.), кодирует мРНК размером 1383 п.н. Ген клонирован и полностью секвенирован.

Для гена *F9* характерна высокая частота спонтанных мутаций —  $4,1 \times 10^6$  за поколение. Как и при гемофилии А, мутации значительно чаще возникают в сперматогенезе, чем в оогенезе.

К 1994 г. в гене *F9* идентифицировано около 400 мутаций. Подавляющее большинство из них — замены нуклеотидов, приводящие к заменам аминокислот или образованию стоп-кодонов. Характерно практически полное отсутствие выраженных мажорных мутаций и доминирующих областей повышенной частоты мутирования. Показано также, что частота G—A или C—T транзиций в CpG-сайтах в 24 раза выше, чем в других местах гена *F9*.

В 40% случаев при тяжелых, ингибиторных формах гемофилии у пациентов обнаруживаются делеции различной протяженности. В одном случае к заболеванию гемофилией В привела инсерция Alu-элемента в экзон 5 гена *F9*. Описано 13 точковых мутаций в промоторной области гена *F9*. Интересно, что одна из мутаций в промоторной области, характеризующаяся тяжелыми клиническими проявлениями заболевания в детском возрасте, приводит к существенному улучшению многих клинических показателей при наступлении половозрелости (см. 3.1).

ДНК-диагностика гемофилии В проводится как косвенным, так и прямым методом. Косвенная диагностика основана на анализе с помощью ПЦР внутригенных полиморфных сайтов: *Taq*I (в положении 11109–11113); инсерционного полиморфизма в интроне А (рестриктазы *Hinf*I и *Dde*I); *Taq*I в интроне F в поло-

жении 72. Метод ПДРФ-анализа информативен примерно у 60–70% всех семей с гемофилией В [Aseev et al., 1994]. Прямая диагностика гемофилии В включает амплификацию геномных фрагментов гена *F9* с последующей детекцией изменений в последовательностях ПЦР продуктов методом СМС (химического расщепления) (см. гл. 2) и прямое секвенирование фрагментов для определения точной молекулярной природы мутаций.

**Семейный рак молочной железы и рак яичников (РМЖ)** диагностируется чуть ли не у каждой 10-й женщины Европы! Приблизительно 5–10% РМЖ являются наследственными. Картированы и идентифицированы два гена – онкоген *BRCA-1* (OMIM–113705) (17q) и *BRCA-2* (OMIM–600185) (13q), мутации в которых и являются причиной семейных РМЖ и яичников. Популяционная частота мутаций в гене *BRCA-1* составляет 1 на 800 женщин, причем 85% таких женщин в возрасте до 70 лет имеют РМЖ. Большие размеры гена *BRCA-1* значительно затрудняют поиск мутаций в его кодирующих частях. Ген состоит из 24 экзонов, его белковый продукт имеет 1683 аминокислотных остатка. Ген *BRCA-2* еще больше, он имеет 27 экзонов, а его белок – 3418 аминокислотных остатков. Сложность ДНК-диагностики заключается в том, что практически каждая семья высокого риска имеет свою собственную мутацию, что делает нереальным скрининг мутаций в этих генах на популяционном уровне. В настоящее время в гене *BRCA-1* уже обнаружено более 300 различных мутаций и примерно 150 мутаций найдено в гене *BRCA-2*. Спектры мутационных повреждений этих генов различны в разных популяциях. Так, только у евреев-ашкенази (большинство евреев Европы и Северной Америки) были обнаружены две мажорные (доминирующие по частоте) мутации: делеция двух нуклеотидов в экзоне 2 в гене *BRCA-1* (185delAG) и делеция одного нуклеотида 6174delT в гене *BRCA-2*. По крайней мере 16% женщин-ашкенази с РМЖ и 39% таких женщин с РМЖ и раком яичников в возрасте до 50 лет имеют эту мутацию, что делает оправданным ее генетический скрининг в этой этнической группе. Примерно у 8% еврейских женщин в возрасте до 40 лет обнаруживают также мутацию 6174delT в гене *BRCA-2*. Среди женщин Великобритании с ранним РМЖ (до 35 лет) только у 3% найдены мутации *BRCA-1* и того меньше (у 1%) – мутации в гене *BRCA-2*.

Комбинированный скрининг мутаций 185delAG (*BRCA-1*) и 6174delT (*BRCA-2*) в сочетании с прямым секвенированием или с новым методом детекции мутации по аномальному белковому продукту гена (*protein truncation test*) (см. гл. 2) резко увеличивают возможности предиктивного тестирования РМЖ. Существующие коммерческие фирмы США широко рекламируют тест прямого секвенирования всех кодирующих последовательностей *BRCA-1* и *BRCA-2* в течение нескольких недель (Myriad Genetic Laboratories). Весьма перспективным для этих целей представляется использование и метода чипов, позволяющего оперативно, в течение нескольких минут, провести тестирование всех известных мутаций этих генов [Nacia et al., 1998].

**Множественные эндокринные неоплазии (МЭНТ1)** (OMIM–131100) – ауто-сомно-доминантный семейный рак, характеризуется гиперплазией паратиреоидных желез в сочетании с различными нейроэндокринными опухолями, включая аденомы гипофиза, опухоли островков поджелудочной железы и эндокринных клеток 12-перстной кишки. Опухоли коры надпочечников, липомы, эпен-

диомы и аденокортикоидные опухоли часто ассоциированы с МЭНТ1. Ген *MEN1*, мутации в котором ответственны за возникновение этого заболевания, является геном-супрессором и картирован на коротком плече хромосомы 11 (11p13). Его белковый продукт состоит из 610 аминокислотных остатков и преимущественно локализуется в ядрах клеток различных тканей [Agarwal et al., 1998]. К настоящему времени в гене идентифицировано более 100 различных мутаций [Mutch et al., 1999]. Мутации довольно равномерно распределены в кодирующих последовательностях гена. Их следствием является аберрантный белковый продукт, не способный выполнять опухоле-супрессивные функции. Большинство семей высокого риска развития МЭНТ1 имеют свой уникальный вариант мутации в гене *MEN1*. Так же как и в случае других раков, точный диагноз и активное выявление субъектов высокого риска заболевания возможно только после точной идентификации природы мутации в гене *MEN1*. Разработка метода чипов, метода детекции мутаций по аберрантному белковому продукту и, наконец, прямое секвенирование кДНК (кодирующей белок части гена) являются эффективными способами идентификации природы мутации гена *MEN1* в таких семьях.

**CRASH-синдром (болезнь L1)** — X-сцепленное врожденное заболевание (частота 1 : 25 000–60 000), клиническая картина которого включает обтурацию Сильвеевого протока, гидроцефалию, спастическую параплегию, агенезию мозолистого тела. Все эти симптомы и синдром в целом связаны с мутациями в гене *LICAM* (OMIM–308840) [Weller, Gartner, 2001]. Ген экспрессируется в нейронах и Шванновских клетках. Продукт гена — белок L1, является иммуноглобулином с адгезивными свойствами, важен для развития и функций нервной системы. Мутации равномерно распределены по всей кодирующей части гена. В настоящее время у 143 пациентов зарегистрировано 36% — миссенс мутаций, 13% — нонсенс мутаций, 24% — коротких делеций, 3% — инсерций и 24% — мутаций, обусловленных дефектами сплайсинга. При этом мажорные (доминирующие по частоте) мутации не выявлены. Мутации идентифицируются с помощью SSCP-анализа, дополненного прямым секвенированием. Открытие гена и выяснение его мутационного спектра открывает возможности для пренатальной диагностики этого тяжелого врожденного заболевания.

**Аутосомно-доминантный поликистоз почек** (OMIM–173900) — одно из наиболее частых моногенных заболеваний (частота 1 на 1000). Заболевание развивается к 60-ти годам. К этому возрасту 50% пациентов обнаруживают выраженный поликистоз почек, быстро прогрессирующую почечную недостаточность, единственным лечением которой является трансплантация почек. Кисты возникают не только в почках, но и в других паренхиматозных органах (печень, поджелудочная железа). Подавляющее большинство случаев (87%) связано с мутациями в гене *PKD1* (16p13.3), который кодирует связанный с мембраной белок — гликопротеин — полицистин 1. Мутации (нонсенс, мелкие делеции, инсерции) равномерно распределены по всей кодирующей части гена. В каждой семье высокого риска обычно определяется своя мутация. Примерно 13% случаев врожденного поликистоза связано с геном *PKD2* (4q21-22), белок полицистин 2. Полицистин 2 функционально и пространственно тесно связан с полицистином 1, образуя рецепторно-мембранный комплекс, регулирующий клеточную адгезию и транспорт ионов  $Ca^{++}$ . При мутациях в гене *PKD2* заболевание протекает более благоприятно: почечная недостаточность развивается только к 65–70 годам.

**Синдром Смита–Лемли–Опитца (OMIM–270400)** — аутосомно-рецессивное заболевание (частота 1 на 15 000–40 000), связанное с нарушением синтеза холестерина. Этот синдром характеризуется следующими признаками: лицевой дисморфизм, задержка умственного развития, микроцефалия, волчья пасть, синдактилия, нарушения дифференцировки пола. Первичный биохимический эффект — нарушение синтеза холестерина из дегидрохолестерина вследствие мутаций в гене *DHCR7*, контролирующего синтез фермента 7-стеро-редуктазы.

Дефицит холестерина в эмбриогенезе ведет к нарушению целостности мембран и дефициту стероидных гормонов, что, в конечном счете, и объясняет основные нарушения морфогенеза [Witsch-Baumgartner et al., 2001]. Ген *DHCR7* (11q13) имеет 14 т.п.н., состоит из 8 экзонов и 7 интронов. Из 73 различных мутаций, известных в этом гене, 65 — это миссенс мутации, преимущественно расположенные в трех доменах белка. Частоты мутаций варьируют в разных популяциях, причем в некоторых из них (Великобритания, Польша) выявлены мажорные мутации.

**Синдром Альпорта, X-сцепленная форма (OMIM–301050)** — генетически гетерогенное заболевание. В 95% случаев встречается X-сцепленная рецессивная форма. Данное заболевание характеризуется прогрессирующей патологией гломерулярного аппарата почек. Нарушение структуры базальной мембраны клубочков при данной патологии сочетается с нарушениями слуха и зрения. Возникновение X-сцепленной рецессивной формы синдрома Альпорта связывают с мутациями в гене *COL4A5*. Этот ген кодирует альфа-5 цепь коллагена 4 типа, картирован на X-хромосоме (Xq22) и состоит из 51 экзона. В настоящий момент известно более 250 мутаций, которые равномерно распределены по длине гена [Hertz et al., 2001].

**Семейный аденоматозно-полипозный рак толстого кишечника (OMIM–175100)** — аутосомно-доминантное заболевание с высоким (до 90%) уровнем пенетрантности, его частота в европейских странах составляет около 1 на 15 000. Данная патология характеризуется появлением уже в детском возрасте от 100 до 1000 аденоматозных узлов (полипов) в ободочном отделе толстой и прямой кишки. В возрасте до 50 лет почти в 100% случаев происходит озлокачествление полипов. Причиной семейного аденоматозно-полипозного рака толстого кишечника являются мутации в гене супрессоре опухолевого роста *APC* (5q21-22). Ген *APC* клонирован и определена его нуклеотидная последовательность. Мутации этого гена достаточно разнообразны и включают точечные мутации, делеции и инсерции. Идентификация мутаций в гене *APC* означает не только однозначное подтверждение диагноза у пациента, но и возможность выявления среди детей и родственников больного лиц высокого риска развития данного заболевания. В настоящее время в этом гене уже идентифицировано более 300 различных мутаций, из которых большая часть (около 60%) находится в экзоне 15 [Scarano et al., 1999]. Амплификация этого экзона, дополненная современными методами детекции мутаций (см. гл. 2), позволяет с высокой эффективностью обнаружить мутацию и в дальнейшем использовать ее в качестве маркера при обследовании близких родственников пациента. Дети, у которых обнаружена мутация гена *APC*, могут быть включены в программу регулярной колоноскопии, а дети без мутации могут быть полностью исключены из дальнейшего обследования. Снятие комплекса психической неопределенности — одно из решающих преимуществ досимптоматиче-



ского тестирования аденоматозно-полипозного рака толстого кишечника [Petersen et al., 1993]. Любопытно, что у евреев-ашкенази 6–7% всех мутаций гена *APC* приходится на мутацию I130K, что делает оправданным ее скрининг у представителей этой этнической группы [Motulsky, 1999].

### *Болезни с мажорными мутациями*

Моногенных болезней с наличием четко определяемых, доминирующих по частоте мажорных мутаций, важных для ДНК-диагностики, сравнительно немного. Наиболее типичные среди них — муковисцидоз, фенилкетонурия, ахондроплазия, рецессивная форма глухоты, болезнь Ретта.

**Муковисцидоз (МВ)** (OMIM—219700) (кистозный фиброз поджелудочной железы) — самое распространенное моногенное наследственное заболевание у представителей белой расы. Белковый продукт гена — трансмембранный регуляторный белок муковисцидоза (cystic fibrosis transmembrane regulator — CFTR), является каналом в апикальных мембранах эпителиальных клеток, через который осуществляется активный транспорт ионов хлора. К началу 2001 г. в гене *CFTR* идентифицированы более 900 точечных мутаций, несколько делеций и дупликаций. Наиболее распространенной для больных МВ Западной Европы и Северной Америки является мутация delF508, приводящая к отсутствию фенилаланина в 508-м положении белка CFTR. В этих регионах частота delF508 находится в пределах 70–85%. В Европе частота мутации обнаруживает определенный градиент с севера на юг и с запада на восток: достигая 85% в Дании, она уменьшается до 50% в Италии и до 20–30% в Турции. В европейской части России она составляет 50–59% всех мутантных (CF) хромосом. У евреев-ашкенази доминирующей по частоте является мутация W1282X (33%). В 1998 г. была обнаружена, подвергнута детальному популяционному анализу и в 2000 г. описана новая мутация, мажорная для славянских народов Европы [Dork et al., 2000]. Мутация CFTRdel21kb представляет собой протяженную делецию 21 т.п.н. с потерей 2 и 3 экзонов гена *CFTR*. Ее частота в России среди больных муковисцидозом находится в пределах 3–4%. В настоящее время в России возможна идентификация известных мутаций в 65–70% хромосом больных муковисцидозом [Ивашенко, 2002]. Согласно нашим данным частоты мажорных (диагностически значимых) мутаций у больных МВ России следующие: delF508 — 50%, CFTRdel21kb — 4%, 2143delT — 4%, 3737delA — 4%, 2184insA — 3%, 394delTT — 2%, W1282X — 2%, G542X — 2%, N1303K — 2%, при этом молекулярная диагностика МВ прямыми методами возможна примерно в 55–60% семей высокого риска МВ. Нами разработан метод мультиплексного ПЦР-анализа, позволяющий в одной реакции идентифицировать такие мажорные мутации, как delF508, CFTRdel21kb, 2184insA, 2143delT, 394delTT и еще 11 ранее описанных мутаций [Ивашенко, 2002]. В случае непрямой диагностики используются полиморфные сайты локусов ДНК, расположенные в непосредственной близости (IRP, D7S8, D7S23, MET) или внутри самого гена *CFTR* — минисателлитные последовательности в интронах 6, 8, 17b гена *CFTR*.

**Фенилкетонурия (ФКУ)** (OMIM—261600) — одно из наиболее частых аутосомно-рецессивных заболеваний, обусловленных наследственным дефектом гена *PAH*, контролирующего синтез печеночного фермента фенилаланингидроксила-

зы. Частота заболевания в России колеблется в пределах 1 на 8000–10 000. Ген *PAH* транскрибируется в гепатоцитах с образованием мРНК размером 2,4 т.п.н. Наиболее распространенный тип мутаций — однонуклеотидные замены (миссенс, нонсенс и мутации в сайтах сплайсинга), крупных структурных перестроек не найдено. Отмечается неравномерный характер внутригенной локализации мутаций. Наибольшее число миссенс мутаций встречается в центральной части гена: в экзонах 7, 9 и 12.

В Европейской части России мажорной мутацией является R408W (экзон 12), частота которой достигает 54%. На практике используют как прямую, так и косвенную ДНК-диагностику ФКУ. Разработан быстрый и эффективный метод определения мутации R408W [Ивашенко и др., 1993; Ivaschenko et al., 1993]. При анализе семей, в которых отсутствуют легко идентифицируемые прямыми методами мутации, молекулярная диагностика может быть проведена с помощью внутригенных полиморфных сайтов рестрикции. Используются, главным образом, STR- и VNTR-полиморфизмы [Goltzov et al., 1992], которые оказались особенно удобными для молекулярного маркирования мутантных аллелей, а также некоторые другие, такие как *Msp*I — полиморфизм в экзоне 8.

#### **Другие моногенные болезни с мажорными мутациями:**

**Синдром Леш–Нихана** (ОМIM—300322) обусловлен изменениями в нуклеотидной последовательности гена гипоксантинфосфорибозилтрансферазы — *HPRT*. 15% всех точечных мутаций составляет мутация Arg170Ter; 15% составляют крупные делеции [Горбунова, Баранов, 1997].

**Болезнь Вильсона–Коновалова** (ОМIM—277900) связана с повреждениями в гене транспортной АТФ-азы В — *АТР7В*. Диагностическую ценность для европейцев представляют мутации His1070Gln и Gly1267Lys, зарегистрированные в 28% и 10% всех мутантных хромосом, соответственно [Thomas et al., 1995].

**Несиндромальная нейросенсорная тугоухость** (ОМIM—220290) с аутосомно-рецессивным типом наследования возникает в результате мутаций гена *GJB2*, кодирующего белок коннексин 26 (Connexin 26 — Cx26). 50% случаев заболевания обусловлены двумя мутациями 35delG и 167delT. Мутация 35delG встречается в 70% семейных случаев в Великобритании, Франции, Италии, Испании, Австралии, Греции, США, Ливии и Тунисе и 30% спорадических случаев; у евреев-ашкенази заболевание обусловлено мутацией 167delT, в Японии — 235delC [Rabionet et al., 2000; Lin et al., 2001].

**Синдром Ретта** (ОМIM—312750). Х-сцепленное доминантное нейрональное заболевание, регрессия ментальных и моторных функций с 2,5 лет, ген *MECP2* (methyl-CpG-binding protein) имеет четыре экзона, белок — 486 аминокислот, избирательная повышенная мутабельность области CpG-связывающего домена, 90% мутаций локализовано в экзоне 4.

**Болезни накопления.** В настоящее время идентифицированы гены, мутации которых приводят к 30 основным метаболическим (лизосомным) болезням. Спектр мутаций в разных лизосомных генах очень разнообразен. В развитии многих из них участвуют точечные мутации, нередко встречаются мажорные мутации, характерные для разных этнических групп. Подробно с мутациями и ДНК-диагностикой болезней накопления можно ознакомиться в серии обзоров и монографий [Горбунова, Баранов, 1997; Пузырев, Степанов, 1997; Горбунова, 1999].

## Болезни, связанные преимущественно с крупными перестройками или делециями генов

**Миодистрофия Дюшенна–Беккера (OMIM–310200)** – сцепленная с полом мышечная дистрофия; выделяют две клинические формы: тяжелую – миодистрофию Дюшенна (МД) и гораздо более мягкую – миодистрофию Беккера (МБ). Ген миодистрофии Дюшенна (*DMD*) – один из самых крупных известных генов человека (2200 т.п.н.), кодирует белок дистрофин, входящий в состав сарколеммы мышечного волокна. У 60% больных мальчиков в гене *DMD* обнаруживаются протяженные делеции, захватывающие от одного до нескольких соседних экзонов. Мутации сосредоточены обычно в двух «горячих» районах – в области 5'-конца гена (экзоны 6–19) и в 3'-конце (экзоны 40–53), при этом 30% делеций локализованы в проксимальной части гена и 70% – в дистальной. Отмечены популяционные особенности паттерна делеций в разных европейских популяциях, а также в популяциях России и стран СНГ. У некоторых пациентов делетирован не только весь ген, но и достаточно протяженные соседние области. Примерно 5% мутаций гена дистрофина составляют дупликации и около 35% – точечные мутации, преимущественно микроделеции (от одного до нескольких нуклеотидов), а также нонсенс мутации. Считается, что в 30% семей с МД и МБ мутации имеют спонтанное происхождение и возникают чаще в оогенезе, а в остальных семьях – это наследственные формы.

Разработаны эффективные методы диагностики делеций в гене *DMD*, основанные на мультиплексной ПЦР. Одновременное тестирование 19 экзонов и промоторной части гена позволяет выявить до 98% всех крупных делеций гена [Baranov et al., 1993].

При отсутствии идентифицируемой мутации применяют косвенный метод ДНК-диагностики с использованием внутргенных полиморфных сайтов: рERT87-8/*TaqI*, рERT87-15/*BamHI*, 124/*PstI*, 16 intron/*TaqI* и аллельных вариантов динуклеотидных СА-повторов в интронах 44, 45, 49, 50 и 64 – STR-44, STR-45, STR-49, STR-50 и STR-H1.

Эмпирически определено, что при наличии спорадических случаев рождения ребенка с МД и при отсутствии прямых молекулярных доказательств гетерозиготного носительства мутации гена дистрофина у матери риск повторного рождения больного ребенка может достигать 14%.

**Адреногенитальный синдром (АГС) (OMIM–201910)** – распространенное ауто-сомно-рецессивное заболевание. В 95% случаев АГС является результатом дефицита фермента 21-гидроксилазы (цитохром P-450C21). Подразделяется на «классическую» и «неклассическую» формы в зависимости от клинического проявления. Частота «классической» формы составляет 1: 5000–10 000 новорожденных, «неклассической» – 1: 27–333 в зависимости от популяции.

Ген 21-гидроксилазы (*CYP21B*) картирован на коротком плече хромосомы 6 (6p21.3). В данном локусе идентифицированы два tandemно расположенных гена – функционально активный ген *CYP21B* и псевдоген – *CYP21A*, неактивный вследствие делеции в экзоне 3, инсерции со сдвигом рамки считывания в экзоне 7 и нонсенс мутаций – в экзоне 8. Оба гена состоят из 10 экзонов, имеют длину 3,4 т.п.н. и отличаются только по 87 нуклеотидам. Как и в случае гемофилии А (см. выше), наличие рядом с кодирующим геном гомологичной ДНК-последова-

тельности зачастую ведет к нарушениям спаривания хромосом в мейозе и, как следствие этого, к конверсии генов (перемещению фрагмента активного гена на псевдоген), либо к делеции части смыслового гена. В обоих случаях функция активного гена нарушается. На долю делеций приходится около 20% мутаций, на долю точечных мутаций, которые чаще всего являются результатом генных конверсий, — 80%. Косвенная диагностика АГС возможна с помощью типирования тесно сцепленных с геном *CYP21B* аллелей генов *HLA A* и *HLA B*, а также аллелей гена *HLA DQA1*. Прямая ДНК-диагностика АГС основана на амплификации отдельных фрагментов генов *CYP21B* и *CYP21A* с помощью полимеразной цепной реакции, их рестрикции эндонуклеазами *HaeIII* или *RsaI* и анализе полученных фрагментов после электрофореза [Evgrafov O.V. et al., 1995]. В основном, используется метод двухступенчатой ПЦР с последующим ПДРФ-анализом отдельных экзонов гена 21-гидроксилазы [Осиновская, 2002].

**Спинальная мышечная атрофия (СМА)** — форма с проксимальным поражением, аутосомно-рецессивное заболевание, характеризующееся поражением моторных нейронов передних рогов спинного мозга, в результате чего развиваются симметричные параличи конечностей и мышц туловища. Это — второе по частоте после муковисцидоза летальное моногенное заболевание (частота 1: 6000 новорожденных).

По тяжести клинических проявлений СМА подразделяют на три типа:

тип I — острая форма (болезнь Верднига—Гоффмана) (ОМIM—253300), проявляется в первые шесть месяцев жизни и приводит к смерти в первые два года жизни;

тип II — средняя (промежуточная) форма (ОМIM—253400) с летальным исходом после двух лет;

тип III — хроническая форма (болезнь Кугельберга—Веландера) (ОМIM—253550) с проявлением первых симптомов прогрессирующей слабости после полутора лет.

Все три формы представляют собой аллельные варианты мутаций одного гена *SMN1* (survival motor neurons) (5q13) размером всего 20 т.п.н. Ген *SMN1* состоит из 8 экзонов, его мРНК содержит 1700 п.н. и кодирует белок, состоящий из 294 аминокислотных остатков с молекулярной массой 32 кДа. Ген *SMN1* дуплицирован. Его копия — *SMN2* (вариант псевдогена) располагается несколько ближе к центру и отличается от гена *SMN1* по восьми нуклеотидам: пять из них находятся в интронах, три — в экзонах 6, 7, 8 [Lefebvre et al., 1995]. Различия в гене и псевдогене можно выявить методом SSCP и ПДРФ-анализа (см. гл. 2).

Большинство транскриптов гена *SMN1* (90%) являются полноразмерными и только около 10% транскриптов не содержат экзон 5 *SMN1* гена. Псевдоген экспрессирует несколько транскриптов, часть из которых не содержит экзон 5 и/или экзон 7. Содержание полноразмерного продукта транскрипции псевдогена составляет 20—30% от общей продукции гена *SMN2* [Lefebvre et al., 1995]. Чем больше копий гена *SMN2*, тем легче симптоматика заболевания [Wirth, 2000]. В подавляющем большинстве случаев (98%) СМА является результатом мутаций в гене *SMN1*. При этом у 95% больных СМА основным типом мутаций являются делеции, захватывающие экзон 7 гена *SMN1* [Глотов и др., 2001].

Примерно 2% случаев заболевания СМА вызвано мутациями в соседнем с *SMN1* гене запрограммированной гибели нейронов (*NAIP*). Как и ген *SMN1*, *NAIP* существует в двух вариантах — в виде функционально активной копии и в

виде псевдогена, который имеет делецию экзонов 5 и 6. У пациентов с особенно тяжелой формой СМА нередко (12–18%) встречаются протяженные делеции, включающие сразу оба гена *SMN1* и *NAIP*. Возможная роль повреждений в гене *NAIP* в этиологии СМА оспаривается рядом авторов [Готов и др., 2001].

Прямая молекулярная диагностика СМА возможна у 93–96% больных. Для этого проводится амплификация фрагментов гена *SMN1* и *SMN2* (экзоны 7 и 8), а также гена *NAIP* (экзоны 5 и 13). Продукты амплификации исследуют с помощью метода SSCP анализа.

**Болезнь Шарко–Мари–Тус** – моторно-сенсорная нейропатия периферической нервной системы, связанная с прогрессивной дегенерацией периферических нервов, атрофией и слабостью дистальных мышц конечностей. Заболевание генетически гетерогенно. Наиболее изучен с точки зрения молекулярного механизма тип СМТ1А (ОМIM–118220). Ген картирован на хромосоме 17 (17p11.2), не идентифицирован, но у 70,7% больных отмечается тандемная дупликация длиной до 1,5 т.п.н., захватывающая ген *PMP22*, ответственный за синтез периферического миелинового белка 22 [Mostanchinolo et al., 2001]. Размеры дублированных фрагментов могут варьировать. Метод диагностики – гель-электрофорез в пульсирующем электрическом поле необычных рестрикционных фрагментов, образующихся на границах вовлеченных в перестройку участков ДНК [Горбунова и др., 2000].

**Болезнь Гоше** (ОМIM–230900) – самая частая лизосомная аутосомно-рецессивная болезнь накопления связана с повреждениями гена глюкоцереброзидазы (лизосомной гидролазы) – *GBA* (1q21), рядом с которым располагается псевдоген – *psGBA*. Различают три клинических типа: 1) хроническая не нейролитическая форма; 2) острая нейролитическая форма; 3) хроническая или подострая нейролитическая форма.

Отмечается корреляция клинического фенотипа и тяжести мутаций. Мутации нулевого типа – отсутствие белка (летальны до рождения), тяжелые мутации – аберрантный коротко живущий продукт, умеренные мутации (белок нормальной стабильности, низкой энзиматической активности). Наряду с многочисленными (115) точковыми мутациями найдено много сложных мутаций типа дупликаций, делеций, конверсий, возникающих в результате ошибок спаривания и обменов в мейозе между геном и псевдогеном.

### **Болезни, обусловленные экспансией повторов ДНК**

Впервые этот тип мутаций был обнаружен в 1991 г. при молекулярном анализе синдрома X-сцепленной умственной отсталости (синдром ломкой (фрагильной) X-хромосомы, синдром Мартина–Белл). Оказалось, что причиной заболевания является увеличение числа триплетных (CGG) повторов в 5'-нетранслируемой части гена *FMRI*. «Экспансия» повторов сопровождается метилированием промоторной области и нарушением работы гена *FMRI*. В дальнейшем были описаны другие наследственные заболевания, которые вызваны таким же типом мутаций, получивших название «динамических». За этой группой заболеваний исторически закрепилось название болезней «экспансии», поскольку их молекулярную основу составляет рост числа коротких нуклеотидных повторов, приводящих к нарушению функции гена или появлению необычного белкового продукта, обладающего токсическим действием.

В течение последующих нескольких лет был описан целый ряд других заболеваний, обусловленных динамическими мутациями. В настоящее время таких болезней насчитывается уже около 20, и, по всей вероятности, их число будет возрастать [Mandel, 1997]. Любопытно, что динамические мутации пока описаны только для человека и не обнаружены у других млекопитающих, включая человекообразных обезьян, хотя в соответствующих местах гомологичных генов у них, а также у лабораторных мышей, обнаружены аналогичные тандемные повторы, которые, однако, никогда не подвергаются экспансии.

Таким образом, человек пока является единственным видом млекопитающих, у которого встречается этот тип мутаций. По-видимому, в силу пока не совсем понятных причин именно хромосомам человека свойственны такие мутации. Установлено, что динамические мутации далеко не всегда связаны с каким-то заболеванием, однако, они нередко ассоциированы с ломкими сайтами различных хромосом (FraXF, Fra16A, Fra16B, Fra11) [Richards, Sutherland, 1997].

Список заболеваний, обусловленных динамическим типом мутаций, приведен в табл. 8. 15 из 16 болезней вызваны нарастанием числа трех нуклеотидов (триплетные повторы). Подавляющее большинство заболеваний (12) связано с экспансией CAG повтора, 2 – с экспансией CGG (FRAXA, FRAXE) и 1 – с CAA (атаксия Фридрейха). Повторы могут располагаться в промоторной области гена (гены *FMRI*, *FMR2*), в его транскрибируемой, но нетранслируемой части (ген *DMPK*), входить в состав последовательности экзонов (все гены нейродегенеративных заболеваний), присутствовать внутри интрона (*FRDA*). В зависимости от фенотипического проявления все динамические мутации подразделяются на мутации с эффектом «минус», т.е. приводящие к нарушению работы гена (FRAXA, FRAXE, миотоническая дистрофия, атаксия Фридрейха, миоклонусная эпилепсия) и мутации с эффектом «плюс», обусловленным появлением необычных белковых продуктов, обладающих токсическим действием и вызывающих повреждение подкорковых структур мозга (все остальные болезни). Естественно, что механизм действия мутантных аллелей при разных болезнях экспансии имеет свои особенности. Так, в случае «минус» мутаций, основу патологического процесса могут составлять: 1) выключение работы гена вследствие инактивации промотора (*FMRI*, *FMR2*); 2) нарушения механизмов транскрипции (*DMPK*, *FRDA*). В генезе патологического эффекта «плюс» мутаций основная роль принадлежит белковым продуктам соответствующих генов с необычно длинными полиглутаминовыми трактами (триплет CAG кодирует глутаминовую кислоту). Обладая иными физико-химическими характеристиками, такие белки приобретают и необычные биохимические свойства, в чем-то сходные с белками прионовых болезней. Накапливаясь в нервных клетках, они начинают оказывать токсический эффект и вызывают направленную гибель нервных клеток в строго специфических, как правило, подкорковых отделах мозга [Иллариошкин и др., 1995].

Несмотря на разный состав и протяженность повторов, все болезни экспансии обладают рядом общих свойств [Мальшева, 2001]:

- 1) повторяющиеся группы нуклеотидов всегда присутствуют в норме в соответствующих генах и полиморфны по числу копий;
- 2) практически для всех болезней экспансии характерен доминантный тип наследования;

Таблица 8

## Болезни, связанные с экспансией повторов ДНК

Заболевание	Ген, локус	Повторяющийся элемент	Количество повторов		
			в норме	премутация	при болезни
Синдром Мартина—Белл (ломкой X-хромосомы, FRAXA)	<i>FMRI</i> , Xq27.3	(CCG) <sub>n</sub>	5–54	55–230	>230 (до 3000)
Синдром ломкой X-хромосомы тип 2 (FRAXE)	<i>FMRI2</i> , Xq28	(CCG) <sub>n</sub>	6–35	до ~200	>200
Миотоническая дистрофия	<i>DMPK</i> , 19q13.3	(CTG) <sub>n</sub>	5–37	42–150	>150 (до 3000)
Хорея Гентингтона	<i>IT-15</i> , 4p16.3	(CAG) <sub>n</sub>	9–34	25–39	36–100
Спино-бульбарная мышечная атрофия (болезнь Кеннеди)	<i>AR</i> , Xq13	(CAG) <sub>n</sub>	12–33	?	40–62
Дентато-рубро-паллидолюйсовая атаксия	<i>B37</i> , 12p.12	(CAG) <sub>n</sub>	7–34	?	49–75
Спино-церебеллярная атаксия тип 1	<i>SCA1</i> , 6p22	(CAG) <sub>n</sub>	25–36	?	43–81
Спино-церебеллярная атаксия тип 2	<i>SCA2</i> , 12q23	(CAG) <sub>n</sub>	15–29	?	35–59
Спино-церебеллярная атаксия тип 3 (болезнь Мачадо—Джозефа)	<i>MJD</i> , 14q23.3	(CAG) <sub>n</sub>	13–36	?	68–79
Спино-церебеллярная атаксия тип 6	<i>CACNL1A4</i> , 19p13	(CAG) <sub>n</sub>	4–17	?	21–30
Спино-церебеллярная атаксия тип 7	<i>SCA7</i> , 3p12	(CAG) <sub>n</sub>	7–17	?	38–130
Спино-церебеллярная атаксия тип 8	<i>SCA8</i> , 13q21	(CTG) <sub>n</sub>	16–37	<92	107–600
Спино-церебеллярная атаксия тип 12	<i>PPP2R2B</i> , 5q31-q33	(CAG) <sub>n</sub>		?	66–93
Аутосомно-доминантная спастическая параплегия	<i>SPG4</i> , 2p21-p24	(CAG) <sub>n</sub>		?	>60
Атаксия Фридрейха	<i>FRDA</i> , 9q13	(CAA) <sub>n</sub>	6–22	40–60	200–900
Миоклонус-эпилепсия Унферрихта—Лундберга	<i>CSTB</i> , 21q22.3	(12C/G) <sub>n</sub>	2–3	12–17	>60

3) заболевание начинается только по достижении какого-то определенного числа копий, при этом пороговые значения этой величины, отделяющие норму от патологии, варьируют для разных генов;

4) существует прямая корреляция между числом повторов и тяжестью заболевания;

5) мутантные аллели с увеличенным числом повторов проявляют как митотическую, так и мейотическую нестабильность, которая составляет молекулярную

основу феномена «антиципации» — нарастания тяжести клинических проявлений заболевания в последующих поколениях;

б) нарастание числа повторов и, соответственно, феномен антиципации может проявляться по-разному, в зависимости от того, передается мутантный аллель по мужской или по женской линиям. Так, при многих нейродегенеративных заболеваниях, обусловленных динамическими мутациями, тяжесть заболевания особенно быстро нарастает при передаче мутантного аллеля от отца; в случае миотонической дистрофии, напротив, — при передаче от матери;

7) митотическая нестабильность, обычно проявляющаяся уже на самых ранних стадиях эмбриогенеза и приводящая к тканевому мозаицизму, особенно характерна для заболеваний со значительной экспансией повторов, таких как синдром ломкой X-хромосомы (FRAXA) и миотоническая дистрофия. Характерным для тканевого мозаицизма является наличие в разных тканях индивидуума или даже в пределах одной ткани мутантных аллелей с разным числом повторов. Прямые наблюдения показывают наличие соматического мозаицизма при миотонической дистрофии у плодов 13–16 недель внутриутробного развития, причем длина повторов в разных тканях остается нестабильной в течение всей жизни;

8) для многих болезней экспансии доказано существование четкого сцепления мутантного аллеля с определенной хромосомой, т.е. определенным гаплотипом, что, по-видимому, свидетельствует в пользу наличия эффекта «основателя» при возникновении и сохранении в популяции такой мутации.

Для каждой болезни «экспансии» разработан свой вариант диагностики, основанный на ПЦР-анализе. Амплификация области триплетных повторов и электрофоретический анализ синтезированных продуктов позволяют определить число повторов, т.е. провести генотипирование аллелей [Горбунова, Баранов, 1997]. Вместе с тем, при числе повторов более двухсот диагностика с помощью ПЦР затруднена. В этих случаях размеры участка повторов определяют методом блот-гибридизации с соответствующими ДНК-зондами. Например, используют зонды StB12.3, Oх1.9 или Oх0.55 в случае синдрома FRAXA; зонд сDNA25 — в случае миотонической дистрофии. Недавно отечественными авторами был предложен достаточно простой и надежный метод диагностики синдрома ломкой X-хромосомы. Метод позволяет надежно различить образцы ДНК с метилированным (инактивированным) промотором гена *FMR1* и неметилированным, т.е. функционально активным, что позволяет проводить дифференциальную молекулярную диагностику этого синдрома среди других форм умственной отсталости [Стрельников и др., 2000].

Подробнее с этой интересной группой заболеваний можно ознакомиться в ряде обзоров ([Баранов и др., 1994; Иллариошкин и др., 1995; 1996; Willems, 1994; Mandel, 1997; Горбунова, 1999]).

## ДНК-диагностика моногенных болезней в России

Впервые молекулярная диагностика в России была проведена в 1989 г. в семьях с муковисцидозом и гемофилией А [Шварц и др., 1989; Асеев и др., 1989]. В течение последующих лет была налажена ДНК-диагностика и для таких частых наследственных болезней, как миодистрофия Дюшенна, фенилкетонурия, синдром ломкой X-хромосомы, миотоническая дистрофия, хорея Гентингтона, адреноге-



нитальный синдром и некоторые другие. Обзор ранних отечественных работ по молекулярной диагностике наследственных болезней представлен в ряде научных сводок [Евграфов, Макаров, 1991; Vaganov, 1993; Баранов, 1994].

Более подробную информацию о современном состоянии ДНК-диагностики наследственных болезней в России можно получить в следующих обзорах и монографиях [Горбунова, Баранов, 1997; Пузырев, Степанов, 1997; Новиков, Евграфов, 1999; Баранов и др., 1997; Баранов, 2000].

На сегодняшний день в стране диагностируется около 30 различных моногенных болезней и наследственных синдромов (см. табл. 8). Приведенная сводка основана на результатах анализа работ основных отечественных лабораторий и публикаций, связанных с проблемой молекулярной диагностики наследственных болезней. Она не является исчерпывающей и включает преимущественно те заболевания, для которых возможна или уже проводится диагностика на внутриутробных стадиях развития.

Отметим, что в настоящее время в России возможна диагностика практически всех основных, т.е. наиболее тяжелых и частых наследственных болезней. Более того, принципиально возможна, а в некоторых случаях и проводится, диагностика некоторых редких заболеваний, для которых уже известен мутантный ген и ясна молекулярная стратегия диагностики. Правда, такой подход сопряжен со значительными материальными затратами. Молекулярная диагностика в России проводится в четырех Федеральных медико-генетических центрах в Москве, Санкт-Петербурге, Томске, а также в Уфимском научном центре и Новосибирском областном клинико-диагностическом центре.

Факторами, лимитирующими ДНК-диагностику в России, являются: отсутствие Федерального регистра наследственных болезней, низкий уровень клинической (медико-генетической) диагностики генных болезней, недостаточная подготовка врачей — специалистов в области медицинской и клинической генетики, неосведомленность врачей и населения о реальных возможностях ДНК-диагностики в России на современном этапе. Естественным препятствием дальнейшего успешного развития молекулярной диагностики в стране является отсутствие адекватного целевого финансирования. Предшествующими успехами в этом направлении ученые в значительной мере обязаны государственной научной программе «Геном человека», начатой в 1991 г. по инициативе акад. А.А. Баева. Именно в рамках этой научной программы и благодаря ее финансовой поддержке удалось в сравнительно короткий срок разработать и внедрить в практическую медицину страны методы ДНК-диагностики. Завершение «чернового» варианта генома в 2000 г. и, по сути, приостановка этой программы в России в 2001 г. таит в себе реальную угрозу для дальнейшего развития и совершенствования методов ДНК-диагностики в нашей стране.

## Литература

*Асеев М.В., Иващенко Т.Э., Горбунова В.Н.* и др. Выявление гетерозиготного носительства и пренатальная диагностика гемофилии А при помощи ДНК-зондов // Гематология и трансфузиология. 1989. Т. 11. С. 10—13.

*Бакай М.А., Швед Н.Ю., Гембицкая Т.Е.* и др. Генетические факторы, влияющие на фенотипическое проявление муковисцидоза // Медико-генетическая служба СПб. К 30-летию МГЦ. СПб. 1999. С. 79—83.

*Баранов В.С.* Ранняя диагностика наследственных болезней в России (современное состояние и перспективы) // Межд. мед. обзоры. 1994. Т. 2, № 4. С. 236–243.

*Баранов В.С.* Программа «Геном человека» как научная основа профилактической медицины // Вестн. РАМН. 2000. № 10. С.27–37.

*Баранов В.С., Баранова Е.В., Иващенко Т.Э., Асеев М.В.* Геном человека и гены «предрасположенности». Введение в предиктивную медицину. СПб.: Интермедика, 2000. 271 с.

*Баранов В.С., Вахарловский В.Г., Айламазян Э.К.* Пренатальная диагностика и профилактика врожденных и наследственных заболеваний // Акуш. и гин. 1994. № 6. С. 8–11.

*Баранов В.С., Горбунова В.Н., Вахарловский В.Г.* и др. Наследственные болезни. В кн.: Медицинская лабораторная диагностика (программы и алгоритмы). Т. 3. — Ред. А.И. Карпищенко. СПб.: Интермедика, 1997. С. 180–202.

*Бочков Н.П.* Генетика человека и клиническая медицина // Вестн. РАМН. 2001. № 10. С. 5–8.

*Бочков Н.П.* Клиническая генетика. М.: Медицина, 1997. 287 с.

*Гайцхоки В.С.* Молекулярная генетика человека: достижения, проблемы, перспективы // СПб., 1994. Актовая речь. 25 с.

*Гинтер Е.К.* Популяционная генетика и медицина // Вестн. РАМН. 2001. № 10. С. 25–31.

*Глотов А.С., Киселев А.В., Иващенко Т.Э., Баранов В.С.* Анализ делеционных повреждений в генах SMN1, SMN2 и NAIP у пациентов со спинальной мышечной атрофией Северо-Западного региона России // Генетика. 2001. Т. 37, № 8. С. 1156–1159.

*Горбунова В.Н.* Молекулярные основы медицинской генетики. СПб.: Интермедика, 1999. 213 с.

*Горбунова В.Н., Баранов В.С.* Введение в молекулярную диагностику и генотерапию наследственных заболеваний. СПб.: Специальная литература, 1997. 287 с.

*Горбунова В.Н., Савельева-Васильева Е.А., Красильников В.В.* Молекулярная неврология. Заболевания нервно-мышечной системы. СПб.: Интермедика, 2000. 318 с.

*Давиденков С.Н.* Клинические лекции по нервным болезням. М.: Медгиз, 1952. 254 с.

*Евграфов О.В., Макаров В.Б.* ДНК-диагностика наследственных заболеваний // Итоги науки и техники: Генетика человека. 1991. Т. 9. С. 53–126.

*Иващенко Т.Э., Асеев М.В., Баранов В.С.* Методы молекулярной диагностики генных болезней. Медицинские лабораторные технологии. Справочник. СПб.: Интермедика, 1999. Т. 2. С. 603–617.

*Иващенко Т.Э., Белова Е.Г., Баранов В.С.* Простой и надежный метод детекции мутации R408W 12-го экзона гена фенилаланингидроксилазы в молекулярной диагностике фенилкетонурии // Генетика. 1993. Т. 29. С. 862–865.

*Иващенко Т.Э., Баранов В.С.* Биохимические и молекулярно-генетические основы патогенеза муковисцидоза. СПб.: Интермедика, 2002. 256 с.

*Иллариошкин С.Н., Иванова-Смоленская И.А., Маркова Е.Д.* Новый механизм мутаций у человека — экспансия тринуклеотидных повторов // Генетика. 1995. Т. 31. С. 1478–1489.

*Иллариошкин С.Н., Иванова-Смоленская И.А., Маркова Е.Д.* и др. Анализ экспансии тринуклеотидных повторов как нового механизма мутации при хорее Гентингтона: теоретические и прикладные аспекты // Там же. 1996. Т. 32. С. 103–109.

*Колчанов Н.А., Ананько Е.А., Колпаков Ф.А.* и др. Генные сети // Мол. биол. 2000. Т. 34, № 4. С. 617–629.

*Малышева О.В., Иващенко Т.Э., Баранов В.С.* Популяционный и семейный анализ CAG-повторов в гене IT-15 // Генетика. 2001. Т. 37, № 3. С. 402–406.

*Новиков П.В., Евграфов О.В.* ДНК-диагностика наследственных заболеваний у детей Российской Федерации: состояние и проблемы // Рос. вест. перинат. педиатр. 1999. № 5. С. 9–14.

*Осиновская Н.С.* Особенности проведения молекулярной диагностики при врожденной гиперплазии коры надпочечников / Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике, вып. 2. Новосибирск: Альфа Виста, 2002. С. 111–118.

*Пузырев В.П., Степанов В.А.* Патологическая анатомия генома человека. Новосибирск: Наука, 1997. 223 с.

*Светлов П.Г.* Физиология (механика) развития. Л.: Наука, 1978. Т. 2. 263 с.

*Стрельников В.В., Немцова М.В., Блинникова О.Е.* и др. Современные методы ДНК-диагностики синдрома Маргина–Белл // Педиатрия. 2000. № 4. С. 21–25.

*Фогель Ф., Мотульски А.* Генетика человека. М.: Мир. 1989. Т. 1. 308 с.

*Шварц Е.И., Иващенко Т.Э., Гольцов А.А.* и др. Использование метода цепной реакции синтеза ДНК для анализа частоты рестрикционного полиморфизма ДНК-локуса CS7 в популяции и в семьях больных муковисцидозом // Докл. АН СССР. 1989. Т. 307, № 2. С. 467–469.

*Agarwal S.K., Dbelenko L.V., Beth Kester M.* et al. Analysis of recurrent germline mutations in the MEN1 gene encountered in apparently unrelated families // Hum. Mutat. 1998. Vol. 12. P. 75–82.

*Aseev M., Surin V., Kaboev K.* et al. Allele frequencies and molecular diagnosis in haemophilia A and B patients from Russia and from some Asian republics of the former USSR // Prenat. Diagn. 1994. Vol. 14. P. 513–522.

*Baranov V.S., Gorbunova V.N., Malysheva O.V.* et al. Dystrophin gene analysis and prenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy in Russia // Ibid. 1993. Vol. 13. P. 323–333.

*Baranov V.S.* Molecular diagnosis of some common genetic diseases in Russia and the former USSR: present and future // J. Med. Genet. 1993. Vol. 30. P. 141–146.

*Clausters M., Guittard C., Bozon D.* et al. Spectrum of CFTR mutations in Cystic Fibrosis and in congenital absence of the vas deferens in France // Hum. Mutat. 2000. Vol. 16, № 2. P. 143–156.

*Collins F.S., McKusick V.A.* Implications of the Human Genome Project for medical science // JAMA. 2001. Feb 7. Vol. 285, № 5. P. 540–544.

*Evgrafov O.V., Polyakov A.V., Dzenis I.G., Baharev V.A.* Preliminary investigation of mutations in 21-hydroxylase gene in patients with congenital adrenal hyperplasia in Russia // Hum. Mutat. 1995. Vol. 5. P. 131–136.

*Goltsov A.A., Eisenmith R.C., Konecki D.S.* et al. Associations between Mutations and VNTR in the Human Phenylalanine Hydroxylase Gene // Am. J. Hum. Genet. 1992. Vol. 51. P. 627–636.

*Hacia J.G., Brody L.C., Collins F.S.* Application of DNA chips for genomic analysis // Mol. Psychiatry. 1998. Vol. 3, № 6. P. 483–492.

*Hertz J.M., Juncker I., Persson U.* Detection of mutations in the COL4A5 gene by SSCP in X-linked Alport syndrome // *Hum. Mutat.* 2001. Vol. 18, № 2. P. 141–148.

*Heyningen V.* One gene – four syndromes // *Nature.* 1994. Vol. 367. P. 319–320.

*Ivaschenko T.E., Baranov V.S.* Rapid and efficient PCR / StyI test for identification of common mutation R408W in phenylketonuria patients // *J. Med. Genet.* 1993. № 30. P. 153–154.

*Jimenez-Sanchez G., Childs B., Valle D.* Human disease genes // *Nature.* 2001. Vol. 409, № 6822. P. 853–855.

*Lefebvre S., Burglan L., Reboullet S.* et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy – determining gene // *Cell.* 1995. Vol. 80. P. 165–185.

*Lin D., Goldstein J.A., Mhatre A.N.* et al. Assessment of denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) in screening for mutations in Connexin 26 (GJB2) // *Hum. Mutat.* 2001. Vol. 18. P. 42–51.

*Mandel J.L.* Human genetics. Breaking the rule of three // *Nature.* 1997. Vol. 386, № 6627. P. 847–51.

*Mostanchinolo M.L., Righetti E., Zorten N.* et al. Charkot–Marie–Tooth disease Type 1 and related demyelinating neuropathies: mutation analysis in a large cohort of Italian families // *Hum. Mutat.* 2001. Vol. 18. P. 32–41.

*Motulsky A.* If I had a gene test, what would I have and who would I tell? // *Lancet.* 1999. Vol. 354 (suppl.). P. 35–37.

*Mutch M.G., Dilley W.G., Sanjurjo F.* et al. Germline mutations in the multiple endocrine neoplasia type 1 gene: evidence for frequent splicing defect // *Hum. Mutat.* 1999. Vol. 13. P. 175–185.

*Petersen G.M., Francomano C., Kinzler K., Nakamura Y.* Presymptomatic direct detection of adenomatous polyposis coli (APC) gene mutations in familial adenomatous polyposis // *Ibid.* 1993. Vol. 91. P. 307–311.

*Rabionet R., Gasparini P., Estiville X.* Molecular genetics of hearing impairment due to mutations of gap-junction gene encoding beta-connexins // *Ibid.* 2000. Vol. 16, № 3. P. 190–203.

*Richards R., Sutherland G.* Dynamic mutations: possible mechanisms and significance in human diseases // *TIBS.* 1997. Vol. 22, № 11. P. 432–436.

*Rozmacher R., Wilschanski M., Matin A.* et al. Modulation of disease severity in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator deficient mice by a secondary genetic factor // *Nature Genet.* 1996. Vol. 12. P. 280–287.

*Scarano M.I., De Rosa M., Panariello L.* et al. Familial adenomatous polyposis coli: five novel mutations in exon 15 of APC gene in Italian patients // *Hum. Mutat.* 1999. Vol. 13. P. 257.

*Thomas G.R., Forbes J.R., Roberts E.A.* et al. The Wilson disease gene: spectrum of mutations and their consequences // *Nature Genet.* 1995. Vol. 9. P. 210–217.

*Weller S., Gartner U.* Genetic and clinical aspects of X-linked hydrocephalus (L-1 disease): mutations in L1Cam Gene // *Hum. Mutat.* 2001. Vol. 18. P. 1–12.

*Willems P.J.* Dynamic mutations hit double figures // *Nature Genet.* 1994. Vol. 8. P. 213–215.

*Wirth B.* An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy // *Hum. Mutat.* 2000. Vol. 15, № 3. P. 228–237.

*Witsch-Baumgartner M., Luffler J., Utermann G.* Mutations in human DHCR7 gene // *Ibid.* 2001. Vol. 17. P. 172–182.

### 3.2. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ РАСПРОСТРАНЕННЫХ МУЛЬТИФАКТОРИАЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

В.П. Пузырев, В.А. Степанов, М.Б. Фрейдin

На рис. 26 приведена схема парадигмы генетической этиологии сложного наследуемого мультифакториального заболевания (МФЗ). Она предложена для конкретного заболевания (*коронарный атеросклероз*), но основные ее элементы носят универсальный характер. Представим кратко комментарии к основным разделам данной схемы.

**Локализация генов.** Основные подходы к локализации генов на хромосомах изложены в предыдущих главах. Отметим только, что в отношении МФЗ, наряду с поиском «генов-кандидатов» для анализа генетического сцепления и ассоциаций, в настоящее время используются сотни различных ДНК-маркеров (полный геномный поиск — genome-wide search). Но до сих пор полный геномный поиск сцепления для этой группы патологии у человека — редкость.

**Идентификация генов.** Локализованные до определенного района хромосомы гены могут быть идентифицированы (при использовании знаний о метаболизме и патофизиологии МФЗ) методом позиционного клонирования или с помощью комбинации подхода кандидатных генов и позиционного клонирования (*позиционно-кандидатный подход*). Решение этой задачи определяется успехами в детализации геномных карт. Новым мощным средством для идентификации и характеристики генов, вносящих вклад в предрасположенность к МФЗ, являются «метки» экспрессионных маркерных последовательностей — EST (см. выше).



Рис. 26. Схема использования парадигмы для мультифакториальных заболеваний [Boerwinkle et al., 1996]

**Функциональные мутации.** После обнаружения кандидатного гена необходимы поиск вариаций кДНК в исследуемом районе и выяснение их точной природы с помощью секвенирования ДНК. На этом этапе возникает задача дифференциации функциональных вариантов и нейтрального полиморфизма. Трудоемкость решения этой задачи может быть проиллюстрирована примером — известно более 150 мутаций гена рецептора липопротеидов низкой плотности (*LDL*).

**Экспериментальные системы.** Во многих исследованиях создание модельных животных помогает проверить и уточнить работу отдельных генов, участвующих в проявлении сложных признаков и МФЗ независимо от других локусов и средовых факторов. Трансгенная технология дает возможность проверить эффект изменения количества генного продукта, манипулируя числом копий генов. Развитие моделей МФЗ на животных позволяет тестировать функциональные варианты кандидатных генов.

Результаты фундаментальных исследований в области поиска кандидатных генов широко распространенных болезней человека для практикующего врача важны, если они позволяют предсказать болезнь у пока здорового человека (*предиктивное генетическое тестирование*) или даже у будущего ребенка (*пренатальная диагностика*), а также эффективно проводить этиологическое лечение, включая генотерапию, предупреждать манифестацию болезни, зная тонкие механизмы взаимодействия в системе «генотип—среда». Наука и медицинская практика еще в начале этого пути, но движение началось, и получены подтверждения правильности избранного направления исследований. В настоящей главе будут представлены данные о кандидатных генах некоторых широко распространенных МФЗ.

## Гены-кандидаты сердечно-сосудистых заболеваний\*

Среди генетиков существует мнение о том, что кардиология позднее всех других клинических дисциплин ассимилировала идеи «новой биологии». Но в последние годы и в этой области медицины сформировалось новое направление — *генетическая кардиология*, интегрирующая концепции и технологии молекулярной генетики для познания этиологии и патогенеза клинического полиморфизма сердечно-сосудистых заболеваний человека [Schwartz, 1994; Пузырев, 2000, 2003]. Начало положили исследования молекулярных основ семейных случаев ЭКГ-синдрома удлиненного интервала QT (*LQTS*) и кардиомиопатий.

**Синдром удлиненного интервала QT (*LQTS*)** — одна из частых форм наследуемых аритмогенных болезней сердца. Известно два клинических типа *LQTS*: более распространенная аутосомно-доминантная форма с изолированным сердечным фенотипом (аномально удлиненная желудочковая реполяризация, фиксируемая на ЭКГ по длине QT; желудочковая тахикардия, переходящая в фибрилляцию, сопровождающаяся потерей сознания и нередко завершающаяся внезапной смертью) — синдром Романо—Уорда и редкая аутосомно-рецессивная форма (синдром Джервелла и Ланге — Нильсена), при которой сердечная симптоматика сочетается с врожденной глухотой (кардиоаурикулярный синдром). В табл. 9 представлены все известные гены этого заболевания. Однако их, вероятно больше, так как описаны семьи, в которых корреляция не наблюдалась ни с одним из этих ло-

\* Авторы данного раздела В.П. Пузырев и В.А. Степанов.

Таблица 9

## Гены-кандидаты синдрома удлиненного QT (LQTS)

Болезнь	Локализация на хромосоме	Ген	OMIM	Тип наследования
LQTS (синдром Романо–Уорда)				
LQT1	11p 15.5	<i>KCNQ1</i> ( <i>KvLQT1</i> )	192500	АД
LQT2	7q35-q36	<i>KCNH2</i> ( <i>HERG</i> )	152427	АД
LQT3	3p21-p24	<i>SCN5A</i> <i>SCNE1</i> <i>SCN4A</i>	600163 603830 603967	АД
LQT4	4q25-q27	?	600919	АД
LQT5	21q22.1-q22.2	<i>KCNE1</i> (min K)	176261	АД
LQT6	21q2.	<i>KCNE2</i>	603796	АД
LQTS (синдром Джервелла и Ланге–Нильсена)	11p15.5 21q22.1-q22.2	<i>KCNQ1</i> ( <i>KvLQT1</i> ) <i>KCNE1</i>	220400	АР

Примечание. АД – аутосомно-доминантный, АР – аутосомно-рецессивный.

кусов. Все гены LQTS (кроме пока не идентифицированного LQT4) кодируют белки ионных каналов – натриевого (SCN5A) и калиевого.

Особенность аутосомно-рецессивного синдрома Джервелла и Ланге–Нильсена состоит в том, что больные пациенты имеют особенно длинный интервал QT и наследуют от фенотипически здоровых родителей чаще различные аномальные аллели двух генов – *KCNQ1* (11p 15.5) и *KCNE1* (21q22.1-q22.2), т.е. являются генетическими компаундами. Для клиницистов важно иметь в виду три следствия изучения молекулярно-генетических основ этого синдрома. Во-первых, значительное число фенотипически здоровых индивидов являются носителями мутаций синдрома LQT. Во-вторых, носители разных мутаций генов LQTS дифференцируются по реакции на нагрузки (физические и эмоциональные). Так, клиническая манифестация LQT1 провоцируется высокой симпатической активностью во время физических нагрузок и эмоционального стресса, а у пациентов с LQT3 клинические проявления возникают во время сна и отдыха. В-третьих, для разных форм LQTS показана геноспецифичная терапия. Препаратами выбора являются блокаторы Na-канала (мексилетин) для пациентов LQT3, β-адреноблокаторы – для лиц с LQT1 и LQT5, пациентам с LQT2 и LQT6 назначают β-адреноблокаторы + препараты, повышающие уровень калия в крови.

**Кардиомиопатии** – другая группа болезней сердца, в изучении которых успехи геномных исследований не менее впечатляющи. В табл. 10 перечислены известные генетические локусы трех форм кардиомиопатий. Наиболее полно изучена семейная гипертрофическая кардиомиопатия (ФНСМ). Картирование области сцепления с ФНСМ на хромосоме 14 было осуществлено в 1989 г., а через год была установлена конкретная мутация гена тяжелой цепи β-миозина (*MYH7*), приводящая к болезни.

В настоящее время картировано восемь ядерных генов, мутации которых приводят к развитию FHCM. Все они кодируют белки, формирующие саркомеры, поэтому эту патологию иногда называют «болезнями саркомера». Кроме упомянутого белка тяжелой цепи  $\beta$ -миозина (*MYH7*), для гена которого известна мутация, ведущая к FHCM, установлена патогенетическая связь с болезнью генов белков основной (*MYL3*) и регуляторной (*MYL2*) цепей  $\alpha$ -миозина, сердечной изоформы тропонина Т (*TNNT2*), тропонина I (*TPM1*) и миозинсвязывающего белка С (*MYBPC3*) — так называемых «главных» генов, отвечающих за развитие FHCM. Выявлена значительная аллельная гетерогенность — в восьми описанных генах найдено 85 различных мутаций. Большинство из них — миссенс мутации, в случае гена миозинсвязывающего белка С большинство мутаций ведет к образованию раннего стоп-кодона, что приводит к синтезу укороченного мутантного белка.

Другие генетические локусы, возможно, также принимают участие в формировании клинического полиморфизма болезни. В их числе называют ген ангио-

Таблица 10

## Гены-кандидаты кардиомиопатий

Тип кардиомиопатий	Локализация на хромосоме	Ген	OMIM	Тип наследования	
Гипертрофическая	14q1	<i>MYH7</i>	160760	АД	
	1q3	<i>TNNT2</i>	191045	АД	
	15q2	<i>TPM1</i>	191010	АД	
	11p11.2	<i>MYBPC3</i>	600958	АД	
	19p13.2-19q13.2	<i>TNNI3</i>	191044	АД	
	3p	<i>MYL3</i>	160790	АД	
	12q23-24.3	<i>MYL2</i>	160781	АД	
	7q3	?		АД	
	мтДНК	<i>MTTL1</i>	590050	Мт	
	мтДНК	<i>MTTG</i>	590035	Мт	
	мтДНК	<i>MTTK</i>	590060	Мт	
	Дилатационная	Xp21.2	<i>DMD</i>	310200	X <sub>сц</sub>
		Xq28	<i>TAZ</i>	300394	АД
		1q21.2	<i>LMNA</i>	150330	АД
1q32		?		АД	
2p31		?		АД	
2q35		<i>DES</i>	125660	АД	
9q13-q21		<i>TMOD?</i>	190930	АД	
10q21-q23		?		АД	
3p22-p25		?		АД	
15q15		<i>ACTC</i>	102573	АД	
1p1-q1		?		АД	
Аритмогенная кардиомиопатия/ дисплазия правого желудочка	14q12-q24	?		АД	
	1q42-43	?		АД	
	2p32.1-q32.2	?		АД	
	17q21	<i>KRT17?</i>	148069	АР	

Примечание. АД — аутосомно-доминантный, АР — аутосомно-рецессивный, X<sub>сц</sub> — X-сцепленный, Мт — митохондриальный.



тензинконвертирующего фермента (*ACE1*, 17q22-q24); найден инсерционно-делеционный полиморфизм в интроне 16, причем генотип DD ассоциирован с большей вероятностью внезапной смерти и более выраженной гипертрофией. Недавно нами было впервые показано, что доля наследственной компоненты в вариабельности массы миокарда левого желудочка и толщины задней его стенки у лиц с идиопатической гипертрофической кардиомиопатией составляет более 20%; гипертрофия левого желудочка чаще встречается у носителей четырех копий 27-членного повтора в этом гене [Степанов и др., 1998]. Известно, что митохондриальные гены играют модифицирующую роль при этом заболевании. Выявлены мутации в генах тРНК (они гетероплазмичны), и доля молекул мтДНК, несущих мутации, коррелирует с тяжестью течения заболевания.

С клинической точки зрения представляют интерес данные о взаимосвязи фенотип–генотип при ГНСМ. Установлено, что особенно «тяжелыми» являются мутации Arg453Cys, Arg403Gln и Arg719Trp в гене *MYN7*; мутации гена миозинсвязывающего белка *C* приводят к более слабым проявлениям патологии; при этом мутации гена тропонина *T* сочетаются с высокой вероятностью внезапной смерти даже при незначительной степени гипертрофии.

Таким образом, при кардиомиопатиях, как и в семейных случаях синдрома удлинённого QT, в формировании патологического фенотипа принимают участие многие гены, но для каждого варианта болезни всегда удастся проследить корреляцию с «главными» генами, в то время как воздействие остальных генов считается модифицирующим.

Большая часть сердечно-сосудистых заболеваний по своей генетической природе относится к полигенным заболеваниям. Более того, полиморфизм генов, ответственных за предрасположенность к этой группе болезней, широко представлен в популяциях, а аллели, ассоциированные с МФЗ, встречаются с частотой более 10% среди здоровой части популяции. В отличие от менделирующей патологии, в основе которой лежат редко встречающиеся мутации «главных» генов, эффект появления которых весьма значителен, при МФЗ – генетическая система полигенов представлена множеством аллелей генов, проявления которых в отдельности незначительны (рис. 27). В этом случае болезнь является результатом аддитивного действия неблагоприятной комбинации («генетических ансамблей») функционально «патогенных» аллелей у индивида.

**Эссенциальная гипертензия (ЭГ).** В отношении ЭГ до сих пор ведутся дискуссии о генетической природе болезни. Одни предполагают, что ЭГ – простой менделевский доминантный признак [Kutz, Spence, 1993] другие обосновывают мультифакториальный характер наследования ЭГ. В связи с предположениями о существовании большого числа генов предрасположенности к ЭГ, широко начаты исследования по идентификации некоторых из них. В табл. 11 приведены гены, участвующие в гомеостазе уровня артериального давления и составляющие структуру наследственной компоненты предрасположенности к эссенциальной гипертензии. По-видимому, это не все известные гены-кандидаты ЭГ.

В последнее время особое внимание привлекает ген *NOS* (ген синтазы окиси азота), продукт которого определяет уровень окиси азота в стенке кровеносных сосудов, регулируемый кальмодулинзависимым механизмом. Идентифицированы три изоформы синтазы окиси азота: индуцибельная, невральная и эндотелиальная. Ген эндотелиальной синтазы окиси азота (*NOS3*), предопределяя ЭГ, как



**Рис. 27.** Классы генов: обратное соотношение между частотой локуса и его эффектом [по Morton N., 1998]

недавно показано, отвечает за предрасположенность к развитию ишемической болезни сердца и способствует тяге к курению [Wang et al., 1996].

Ранее у человека была обнаружена тесная связь развития гипертензии с комбинацией двух признаков — низкого веса при рождении и большого размера плаценты [Benediktsson et al., 1993]. Известно, что плацентарная 11-бета-гидроксистероидная дегидрогеназа (11- $\beta$ -OHSD), которая превращает глюкокортикоиды в неактивные продукты, выполняет защитные функции при беременности. Наряду с данными для человека, авторы показали в эксперименте на крысах, что между активностью 11- $\beta$ -OHSD и ростом новорожденного имеется положительная, а с размером плаценты — отрицательная корреляционная связь. Этот факт нуждается в детальном исследовании.

Среди различных форм артериальной гипертензии (АГ) со сходным фенотипом, для которых характерны семейное накопление, солезависимость и низкий уровень ренина (все это свойственно и ЭГ), выделяют несколько, имеющих особенности клинических проявлений, для них картированы специфические гены. К ним относится синдром Лидлла (псевдоальдостеронизм с АГ), синдром ложной минералокортикоидной избыточности (AME — apparent mineralocorticoid excess) и семейный гиперальдостеронизм, поддающийся лечению небольшими дозами глюкокортикоидов. Ген синдрома Лидлла локализован на 16 хромосоме (16p13-p12), синдрома АМЕ — на хромосоме 1 и в локусе 16q22, а ген гиперальдостеронизма, корригируемого глюкокортикоидами, — на хромосоме 8 (8q21) в области гена цитохрома *P450*. Аллельные варианты этих генов для специфических синдромов (симптоматические артериальные гипертензии) одновременно являются генетическими маркерами предрасположенности к ЭГ и поэтому включены в табл. 11.

**Атеросклероз.** Сложность этиопатогенеза атеросклероза и гипотетичность многих механизмов развития его основных клинических проявлений являются существенным препятствием к выяснению генетических основ развития этой «эпидемии века». В любом случае концепция атерогенеза должна объяснить накопление модифицированных липидов и липопротеидов низкой плотности в сосудистой стенке. Этим и обусловлено пристальное изучение механизмов нарушений липидного обмена при атеросклерозе. По этому вопросу накоплено достаточно много сведений. Приведем обобщающие данные.

Гены-кандидаты гомеостаза артериального давления и эссенциальной гипертензии [Halushka et al., 1999; а также базы данных GDB (<http://godbwww.gdb.org/>), GeneCard (<http://bioinfo.weizmann.ac.il/>)]

Ген	Локализация	Название	Функция белка
<i>ADD1</i>	4p16.3	Аддуцин (альфа)	Белок, связанный с цитоскелетом мембраны, запускает сборку спектрин-актиновой сети. Связывается с кальмодулином
<i>ADD2</i>	2p14-p13	Аддуцин (бета)	Белок, связанный с цитоскелетом мембраны, запускает сборку спектрин-актиновой сети. Связывается с кальмодулином. Кальмодулин связывается предпочтительно с бета-субъединицей
<i>ADM</i>	11pter-11qter	Адренomedуллин	Потенциальный вазодилатирующий и гипотензивный агент. Имеет множественные эффекты, часть из которых связана с физиологическим контролем гомеостаза жидкостей и электролитов в почках. Диуретик и натрий уретик. Ингибирует секрецию альдостерона
<i>ADORA2A</i>	22q11.2	Рецептор аденозина A2a	Рецептор аденозина. Активность рецептора опосредована G-белком, который активирует аденилат-циклазу
<i>ADRB3</i>	8p12-8p11.2	Адренергический бета3 рецептор	Опосредует катехоламин-индуцированную активацию аденилат-циклазы через действие G-белка. Бета-3 вовлечен в регуляцию липолиза и термогенез
<i>AGT</i>	1q42-1q43	Ангиотензиноген	Предшественник ангиотензина
<i>AGTR1</i>	3q21-q25	Рецептор ангиотензина 1	Связанный с G-белком рецептор, включающий два подтипа (AT1A и AT1B). Основной регулятор давления крови (активатор роста сосудистых клеток), ингибитор аденилат-циклазы, активатор фосфолипазы C и A2
<i>AGTR2</i>	Xq22-q23	Рецептор ангиотензина 2	Рецептор ангиотензина. Может играть роль в морфогенезе, росте и развитии
<i>ALDR1</i>	7q35	Семейство альдо-кето-редуктаз, член 1 (редуктаза альдозы)	Катализирует НАДФН-зависимую редукцию широкого спектра углеводород-содержащих веществ в соответствующие им спирты с широким спектром каталитических эффектов
<i>APOA1</i>	11q23	Аполипопротеин AI	Участвует в обратном транспорте холестерина из тканей в печень. Кофактор лецитин-холестерин-ацил-трансферазы
<i>APOA2</i>	1q21-q23	Аполипопротеин AII	Может стабилизировать структуру ЛПВП, связываясь с липидами, и нарушать метаболизм ЛПВП

<i>APOA4</i>	11q23	Аполипопротеин AIV	Может играть роль в секреции и катаболизме хиломикронов и ЛПОНП. Необходим для эффективной активации липазы липопротеинов с помощью АРОСII. Главный компонент ЛПВП и хиломикронов
<i>APOC1</i>	19q13.2	Аполипопротеин CI	Модулирует взаимодействие АРОЕ с бета-мигрирующими ЛПОНП и ингибирует связывание бета-ЛПОНП с белками, родственными рецептору ЛПНП
<i>APOC2</i>	19q13.2	Аполипопротеин CII	Компонент ЛПОНП, активатор некоторых триглицеридлипаз
<i>APOC3</i>	11q23.1-q23.2	Аполипопротеин CIII	Ингибитор липазы липопротеинов и липазы печени, снижает поглощение хиломикронов из лимфы клетками печени. Задерживает катаболизм триглицерид-обогащенных частиц
<i>POC4</i>	19q13.2	Аполипопротеин CIV	Может участвовать в метаболизме липопротеинов
<i>AVP</i>	20p13	Аргининовый вазопрессин	Нейрофизин 2 специфически связывает вазопрессин, который имеет прямое антидиуретическое действие в почках и вызывает вазоконстрикцию периферических сосудов
<i>AVPR2</i>	Xq28	Рецептор аргининового вазопрессина (нефрогенный diabetes insipidus)	Рецептор аргининового вазопрессина. Активность рецептора опосредуется G-белком, который активирует аденилатциклазу
<i>BDKRB2</i>	14q32.1-q32.2	Рецептор брадикинина B2	Ассоциирован с G-белками, которые активируют фосфатодилинозитол-кальциевую систему передачи сигнала
<i>BRS3</i>	Xq26-q28	Бомбезин-подобный рецептор 3	Играет роль в делении половых клеток, их созревании и функционировании. Активность рецептора опосредуется G-белком, который активирует аденилат-циклазу
<i>CALCA</i>	11p15.2-p15.1	Кальцитонин/кальцитонин-подобный полипептид, альфа	Вызывает быстрое, но кратковременное падение уровня кальция и фосфата в крови, запуская инкорпорацию их ионов клетками мозга
<i>CALCNKB</i>	1p36	Хлоридный канал K <sub>b</sub>	Функции включают регуляцию объема клетки, стабилизацию мембранного потенциала, передачу сигнала и трансэпителиальный транспорт
<i>CYH</i>	14q11.2	Химаза 1, тучных клеток	Главный секреторируемый белок тучных клеток с предполагаемой ролью генерации вазоактивного белка и деградации внеклеточного матрикса

Ген	Локализация	Название	Функция белка
<i>CYP11B1</i>	8q21	Цитохром P450, подсемейство ХIВ (стероидная бета-гидролаза), полипептид 1	Локализован в митохондриях
<i>CYP11B2</i>	8q21-q22	Цитохром P450, подсемейство ХIВ (стероидная бета-гидролаза), полипептид 2	Предпочтительно катализирует превращение 11-деоксикортикостерона в альдостерон через кортикостерон и 18-гидроксикортикостерон
<i>DBH</i>	9q34	Дофамин-бета-гидролаза (дофамин-бета-монооксигеназа)	Превращает дофамин в норадреналин
<i>DCP1</i>	17q23	Дипептилил карбоксипептидаза 1 (ангиотензин-превращающий фермент 1, ACE)	Катализирует превращение ангиотензиногена в ангиотензин
<i>DRD1</i>	5q35.1	Рецептор дофамина D1	Один из пяти (D1-D5) типов рецептора дофамина. Активность опосредована G-белками, активирующими аденилатциклазу
<i>EDN1</i> <i>EDNRA</i>	6p24.1 Chr.4	Эндотелин 1 Рецептор эндотелина тип А	Эндотелиальный вазоконстрикторный белок Рецептор эндотелина 1. Опосредует его действие через взаимодействие с G-белком, активирующим фосфатидилинозитол-кальциевую систему передачи сигнала
<i>EDNRB</i>	13q22	Рецептор эндотелина тип В	Неспецифический рецептор эндотелина 1, 2 и 3. Опосредует их действие через взаимодействие с G-белком, активирующим фосфатидилинозитол-кальциевую систему передачи сигнала
<i>GALNR</i> <i>GCG</i>	18q23 2q36-q37	Рецептор галанина 1 Глюкагон	Запускает гидролиз гликогена и липидов и повышает уровень сахара в крови
<i>GCGR</i>	17q25	Рецептор глюкагона	Играет центральную роль в регуляции уровня глюкозы, контролируя скорость продукции глюкозы клетками печени и секрецию инсулина

<i>GH1</i>	17q22-q24	Гормон роста 1	Контроль роста
<i>GH2</i>	17q22-q24	Гормон роста 2	
<i>GIPR</i>	19q13.3	Кишечный ингибиторный рецептор полипептидов	
<i>GNB3</i>	12p13	Гуанин нуклеотид-связывающий белок (G-белок), бета-полипептид 3	Вовлечен в различные трансмембранные сигнальные системы в качестве модулятора или трансдучера. Бета- и гамма-цепи необходимы для GTP-азной активности, замещения GDP на GTPи для G-белок-эффекторных взаимодействий
<i>GYS1</i>	19q13.3	Синтаза гликогена 1 (мышечная)	Перемещает остаток гликозила с UDP-glc на нередуцированный конец альфа-1,4-глюкана
<i>HP</i>	16q22.1	Гаптоглобин	Связывает свободный гемоглобин плазмы, предотвращая потерю железа через почки и защищая почки от повреждения гемоглобином, делая гемоглобин доступным для ферментов деградации
<i>HSD11B1</i>	Chr.1	Гидроксистероидная (11-бета) дегидрогеназа 1	Катализирует обратимое превращение кортизола в неактивный метаболит кортизон
<i>HSD11B2</i>	16q22	Гидроксистероидная (11-бета) дегидрогеназа 2	Модулирует глюкокортикоидную активность на уровне рецептора минералокортикоидов и рецептора глюкокортикоидов
<i>IAPP</i>	12p12.3-p12.1	Амилоидный полипептид	Селективно ингибирует инсулин-стимулируемую утилизацию глюкозы и отложение гликогена в мышцах
<i>ICAM1</i>	19p13.3-p13.2	Внутриклеточная молекула адгезии 1 (CD54), рецептор риновирусов человека	Белок является лигандом для белка адгезии лейкоцитов Ifa-1
<i>ICAM2</i>	17q23-q25	Внутриклеточная молекула адгезии 1	Белок является лигандом для белка адгезии лейкоцитов Ifa-1. Белок ICAM2 может играть роль в рециркуляции лимфоцитов, блокируя Ifa-1-зависимую адгезию клеток. Он опосредует адгезивные взаимодействия, важные для антиген-специфичного иммунного ответа, рециркуляции лимфоцитов и других клеточных взаимодействий
<i>INS</i>	11p15.5	Инсулин	Этот рецептор контролируется G-белком. К-канал характеризуется большей тенденцией к потоку калия внутрь клетки, чем наружу
<i>KCNJ11</i>	11p15.1	Калиевый канал, подсемейство J, член 11	

Ген	Локализация	Название	Функция белка
<i>KLK5</i> <i>LRP8</i>	19q13.4 1p34	Калликреин 5 Рецептор ЛПНП – родственный белок 8, рецептор АПОЕ	Может быть вовлечен в отторжение эпителиальных клеток Рецептор ЛПНП – родственный белок 8, рецептор АПОЕ
<i>MLR</i>	4q31.1	Семейство ядер- ных рецепторов 3, группа С, член 2	
<i>NPPA</i>	1p36.2	Предшественник натрийуретического белка А	Натрийуретический фактор является потенциально вазоактивным веществом, синтезирующимся в предсердии, и играет роль в сердечно-сосудистом гомеостазе
<i>NPPB</i>	1p36.2	Предшественник натрийуретического белка В	Действует как сердечный гормон с широким кругом биологических воздействий, включая натрийурез, диурез, вазорелаксацию и ингибирование секреции ренина и альдостерона. Играет ключевую роль в сердечно-сосудистом гомеостазе, помогает восстановить водно-солевой баланс и улучшает сердечную функцию
<i>NPPC</i>	2q24-qter	Предшественник натрийуретического белка С	Обладает сосудорелаксирующей активностью. Имеет сGMP-стимулирующую активность
<i>NPY</i>	7p15.1	Нейропептид Y	Вовлечен в метаболизм и секрецию гонадотропин-освобождающего гормона
<i>NPY1R</i>	4q31.3-q32	Рецептор Y1 нейропептида Y	Рецептор нейропептида Y
<i>PI4</i>	14q31-q32.1	Ингибитор серин- (или цистеин-) протеиназы, клада А (альфа-1 анти- протеиназа, анти- трипсин), член 4	
<i>PLA2G1B</i>	12q23-q24.1	Фосфолипаза A2, группа IB (подже- лудочная железа)	Катализирует кальций-зависимый гидролиз 2-ацильных групп в 3-sn-фосфолиперидах

<i>PNMT</i>	17q21-q22	Фенилметано- ламин N-метил- трансфераза	Превращает норадреналин в адреналин
<i>PTGER3</i>	1p31.2	Рецептор проста- гландина E (подтип EP3)	Может быть вовлечен в ингибирование секреции желудочной кислоты, модуляцию нейротрансмиттерных функций центральных и периферических нейронов, ингибирование реадсорбции натрия и воды в почках и сокращение гладких мышц матки
<i>PTGIS</i>	20q13.11-q13.13	Простагландин I2 (простаглицлин) синтаза	Катализирует изомеризацию простагландина h2 в простаглицлин
<i>PTGS2</i>	1q25.2-q25.3	Простагландин- эндопероксид синтаза 2 (проста- гландин G/H синтаза и цикло- оксигеназа)	Может играть роль главного медиатора воспаления и/или роль простаноидного сигнала
<i>REN</i>	1q32	Ренин	Высокоспецифичная эндопептидаза, единственная известная функция которой – превращение ангиотензиногена в ангиотензин в плазме, инициирующее каскад реакций, продуцирующих увеличение давления крови и задержку натрия в почках
<i>SAH</i>	16p13.11	SA (гомолог - ассоциированного с гипертензией гена у крыс)	
<i>SCNN1G</i>	16p13-p12	Натриевый канал, nonvoltage-gated 1, гамма	Натриевый канал, ингибируемый диуретическим амилоридом
<i>SELE</i>	1q23-q25	Селектин E (эндо- телиальная моле- кула адгезии 1)	Экспрессируется на цитокин-индуцированных клетках и опосредует их связывание с лейкоцитами
<i>SLC2A2</i>	3q26.1-q26.3	Семейство раство- ренных носителей 2, член 2	Транспортер глюкозы. Вероятно, участвует в двунаправленном переносе глюкозы через клеточную мембрану гепатоцитов и отвечает за поглощение глюкозы бета-клетками
<i>SLC2A4</i>	17p13	Семейство раство- ренных носителей 2, член 4	Инсулин-регулируемый транспортер глюкозы



Ген	Локализация	Название	Функция белка
<i>SLC2A5</i>	1p36.2	Семейство растворенных носителей 2, член 5	Вероятно, является транспортером фруктозы
<i>SLC4A1</i>	17q21-q22	Семейство растворенных носителей 4, анионный обменник, член 1	Осуществляет обмен неорганических анионов через мембрану
<i>SLC6A2</i>	16q12.2	Семейство растворенных носителей 6 (транспортеры нейротрансмиттеров, норадреналина), член 2	Терминирует действие норадреналина его высокоаффинным натрий-зависимым поглощением перисинаптическими терминалами
<i>SLC8A1</i>	2p23-p22	Семейство растворенных носителей 8 (натрий/кальциевый обменник), член 1	Переносит $Ca^{2+}$
<i>TBXA2R</i>	19p13.3	Рецептор тромбоксана A <sub>2</sub>	Потенциальный стимулятор агрегации тромбоцитов
<i>TBXAS1</i>	7q34	Тромбоксан А синтаза 1 (тромбоцитарная, цитохром P450, подсемейство V)	
<i>TRH</i>	3q13.3-q21	Тиротропин-освобождающий гормон	Действует как регулятор биосинтеза тиротропина и как нейротрансмиттер/нейромодулятор в центральной и периферической нервной системе
<i>TRHR</i>	8q23	Рецептор тиротропин-освобождающего гормона	

Атерогенный фенотип липопротеинов (ALP) рассматривается как общий наследуемый признак, характеризующийся преобладанием частиц липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) (LDL, подкласс В), высоким уровнем липопротеинов, содержащих повышенное количество триглицеридов (ЛПНОП), пониженным уровнем липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) и в связи с этим — трехкратным увеличением риска инфаркта миокарда. Показано тесное сцепление между ALP и локусом рецептора липопротеинов низкой плотности (Р-ЛПНП); максимальный лод-балл был равен 4,07 в модели со 100%-ной пенетрантностью ALP [Nishina et al., 1992]. Авторы высказывают гипотезу, согласно которой ген, отвечающий за предрасположенность к атеросклерозу, отождествляется с геном *Р-ЛПНП*. Во всяком случае, потенциальный ген развития атеросклероза располагается дистальнее D19S76, в районе гена (19p13.2-p13.12).

С использованием непараметрических количественных методов анализа sib-совых пар и пар родственников в семьях с коронарным атеросклерозом было подтверждено сцепление заболевания с локусом *Р-ЛПНП* (LDLR) [Rotter et al., 1996]. Однако не найдено сцепления с другими кандидатными генами: *АРОВ*, *АРОА2*, *ЛрА*, *АРОЕ* и липопротеинлипазы. Значимое сцепление найдено с локусом транспортного белка эфиров холестерина (СЕТР) на хромосоме 16 и хромосоме 6 с локусом супероксиддисмутазы 1 (*SOD1*). Предполагаемое сцепление обнаружено на хромосоме 11 с кластером *АРОА1/АРОС3/АРОА4*.

К генам-кандидатам атеросклероза относится и ген недостаточности гепаринового кофактора II (*HCF2*). Антикоагуляционное действие гепарина определяется многими гепариновыми кофакторами плазмы крови. Один из них — анти-тромбин III (АТIII). Гепариновый кофактор II (НСII) отличается от АТIII по антигенным характеристикам. Известны семейные случаи низкого уровня НСII у лиц с тромбозом вен и внутрисосудистым диссеминированным тромбозом. Описан 61-летний мужчина, которому четыре раза делали ангиопластику по поводу коронарного атеросклероза с рестенозом коронарных сосудов; гепаринотерапия была неэффективна — лишь применение специфического ингибитора тромбина определило эффективность последней ангиопластики [Matsuo et al., 1992]. В настоящее время ген *HCF2* полностью секвенирован и локализован в районе 22q11.

Известно, что ангиотензин I-конвертирующий фермент (АСЕ) играет важную роль в регуляции артериального давления и электролитного баланса, гидролизует ангиотензин I в ангиотензин II и инактивирует брадикинин. Он также является сильным вазопрессором и регулятором синтеза альдостеронстимулирующего белка. Ген *АСЕ1* картирован на хромосоме 17 (17q22-q24) и также является кандидатным геном атеросклероза [Jeunemaitre et al., 1993]. После клонирования гена *АСЕ* было показано, что 50% индивидуальной изменчивости концентрации АСЕ в плазме крови определяется инсерционно-делеционным (I/D) полиморфизмом в интроне 16 гена. Как оказалось, генотип DD связан с увеличением риска рестеноза после ангиопластики по поводу стеноза коронарных сосудов, вызванного атеросклерозом [Orishi et al., 1993]. Частота делеции в интроне 16 гена *АСЕ* у 132 неродственных индивидов с инсулиннезависимым сахарным диабетом (NIDDM), имевших инфаркт миокарда или значительный стеноз коронарных сосудов, в сравнении со 184 индивидуумами с NIDDM без коронарной болезни, существенно выше [Ruiz et al., 1994]. Авторы утверждают, что аллель *D* является сильным и независимым фактором риска коронарной болезни сердца у лиц с

NIDDM. Причем раннее развитие у них коронарной болезни сердца в этом случае не зависит от уровня липидов и артериального давления. Кроме того, недавно была обнаружена ассоциация между гипертрофией левого желудочка, установленной по ЭКГ-критериям, и DD-генотипом ACE [Schunkert et al., 1994]. Эта связь сильнее у мужчин, чем у женщин, и более четко проявляется у лиц с нормальным артериальным давлением. Следовательно, генотип DD является генетическим маркером, ассоциированным с повышенным риском развития гипертрофии левого желудочка у мужчин в среднем возрасте.

Давно был известен факт, что при гомоцистинурии — наследственном заболевании, обусловленном нарушением метаболизма серосодержащей аминокислоты метионина, вследствие недостаточности цистатионинсинтазы печени, среди клинических проявлений (остеопороз, арахнодактилия, артрит, эктопия хрусталика, умственная отсталость) наблюдается тромбоз артерий и вен. В 1990-е гг. была показана положительная связь между недостаточностью термолабильной N-(5,10)-метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR) и развитием коронарной болезни сердца. У лиц с коронарной болезнью сердца по сравнению с контрольной группой выявляется недостаточность термолабильной MTHFR. Средний уровень гомоцистеина у лиц с такой недостаточностью был существенно (почти в два раза) выше такового у здоровых лиц. Среди 16 облигатных гетерозигот с недостаточностью термолабильной MTHFR обнаружено четыре человека, у которых активность этого фермента в лимфоцитах составила менее 25% нормального уровня. Биохимическое обследование этих лиц подтвердило предположение авторов о том, что эти индивиды являются генетическими компаундами по аллельным мутациям термолабильной MTHFR и термостабильной MTHFR. В 1994 г. ген *MTHFR* был локализован в районе 1p36.3 [Goyette et al., 1994].

Отметим исследование [Kozich et al., 1995], в котором показано, что 30% лиц с преждевременной коронарной болезнью и гипергомоцистинурией, являются гетерозиготами с низкой активностью фермента цистатионин-бета-синтазы (CBS). Связь гипергомоцистинурии с развитием атеросклероза была показана во многих работах. Более того, был известен весьма любопытный факт «устойчивости» сосудов к атеросклеротическому поражению у больных с синдромом Дауна (трисомия по 21 хромосоме) — его связывали с высокой активностью CBS у этих пациентов. Позже показали, что средняя активность CBS в культуре фибробластов больных с синдромом Дауна составляет 166% по сравнению с контролем. Именно эти наблюдения позволили сосредоточить внимание на исследовании хромосомы 21 как места возможной локализации для гена *CBS*. Методом гибридизации соматических клеток ген *CBS* картирован в локусе 21q22.3.

Ранее упоминалась роль гена *NOS3* (эндотелиальная синтаза окиси азота) в качестве предрасполагающего к ЭГ. Эти сведения противоречивы. В недавней работе [Bonpardeaux et al., 1995] не было обнаружено ассоциации ЭГ с высокополиморфными (CA)<sub>n</sub> повторами в интроне 13 и двумя биаллельными маркерами в интроне 18 гена *NOS3*. В то же время появились сведения о роли этого гена в этиопатогенезе коронарного атеросклероза при исследовании 27-членных повторов в интроне 4 5'-конца гена *NOS3* [Wang et al., 1996]. Было идентифицировано два аллеля: большего размера (его частота 0,830) и меньшего (его частота 0,170). Более крупный аллель имел пять tandemных 27-членных повторов. Меньший аллель имел только четыре повтора. При обследовании 549 лиц с коронар-

ной болезнью и 153 здоровых, но курящих (или куривших в прошлом), был обнаружен значительный избыток гомозигот по редкому аллелю у больных с тяжелым стенозом артерий. Этот генотип также ассоциирован с инфарктом миокарда. Авторы отмечают, что поскольку эндотелиальнозависимая вазодилатация опосредуется освобождением NO, уровень которой определяется активностью эндотелиальной синтазы окиси азота, то повышенный риск коронарной болезни у курильщиков — гомозигот по редкому аллелю, связан с предрасположенностью к эндотелиальной дисфункции.

Клиницисты давно отметили, что атеросклероз «ходит» за гипертонией как тень за человеком, а нередко эти две формы патологии вместе сочетаются у одного индивида с ожирением и сахарным диабетом. Более того, современные геномные исследования свидетельствуют о том, что эти болезни часто ассоциированы с одними и теми же генами-кандидатами — генами ангиотензинконвертирующего фермента (*ACE1*), эндотелиальной синтазы окиси азота (*NOS3*), ангиотензиногена (*AGT*), фактора свертывания крови XIII (*F13B*), параоксоназы (*PON*) и некоторыми другими. Многие из тех генов, которые составляют молекулярную основу предрасположенности к атеросклерозу, являются общими с генами-кандидатами ЭГ, приведенными в табл. 11. Это, вероятно, не случайно и является достаточно характерным для МФЗ. Ранее нами [Пузырев, 1991], при анализе эпидемиологических исследований МФЗ в различных странах, была отмечена одна особенность — растущая тенденция к полипатии (множественности болезней) у сегодняшних пациентов. Так, около 40% лиц в возрасте 15–75 лет имеют одновременно две болезни, четыре болезни встречаются у каждого пятого терапевтического больного. Конгломераты болезней (синтропии) могут представлять собой случайные сочетания («соседство» болезней), но могут быть результатом трансгрессирующей общности этиологии и патогенеза («семейства» болезней). В этом смысле изучение «сферы компетенции генов» через оценку их взаимосвязи с широкой патологической панорамой, а не с отдельным МФЗ, совпадает с задачами функциональной геномики.

## Гены-кандидаты бронхолегочных заболеваний\*

Значение наследственных факторов в возникновении и развитии патологии бронхолегочной системы хорошо известно [Пузырев, Огородова, 2000]. В результате геномных исследований установлены конкретные гены, лежащие в основе этиологии и механизмов развития (патогенетика) некоторых болезней этой группы. Среди пациентов пульмонологических стационаров до 60% составляют больные с наследственно детерминированными заболеваниями легких. Общее число генов, вовлеченных в развитие и функционирование бронхолегочной системы, составляет около 2000 [Сойфер, 1998]. Пациенты, страдающие моногенными болезнями легких и бронхов, составляют от 5 до 35% общего числа больных с неспецифическими заболеваниями легких. Их суммарная частота в популяциях человека точно неизвестна, однако не превышает 4 на 1000 населения. Надежные статистические оценки затруднительны, поскольку поражения легких часто имеют место при других наследственных болезнях (синдром Элерса—Данлоса, синдром

\* Авторы данного раздела В.П. Пузырев и М.Б.Фрейдин.

Марфана, мукополисахаридозы, синдром Рандю—Ослера и др.). К моногенным болезням, при которых легочные поражения служат ведущим клиническим проявлением, относятся первичная цилиарная дискинезия (синдром Картагенера), трахеобронхомегалия (синдром Мунье—Куна), первичная легочная гипертензия, синдром Гудпасчера, наследственный спонтанный пневмоторакс и ряд других.

Важно отметить, что гетерозиготные носители мутантных генов вышеназванных моногенных болезней могут быть фенотипически здоровы в отношении состояния бронхолегочной системы, но при воздействии определенных экологических и социальных факторов проявляют либо большую склонность в сравнении с популяционными стандартами к этим же формам патологии или иногда совершенно другим, либо, наоборот, резистентность к определенному кругу внешних факторов, а значит, и болезням. Примером может служить патология — недостаточность  $\alpha_1$ -антитрипсина.

**Недостаточность  $\alpha_1$ -антитрипсина** — распространенное наследственное заболевание, обусловленное сниженной концентрацией  $\alpha_1$ -антитрипсина в сыворотке крови вследствие различных мутаций в гене *Pi*, проявляющееся чаще всего в виде хронических неспецифических заболеваний легких с развитием эмфиземы, а также поражением печени и сосудов.

Ген *Pi*, картирован на длинном плече хромосомы 14. Известна его полная нуклеотидная последовательность и более 75 аллельных вариантов. Наиболее частым аллелем гена *Pi* является *PiZ*. Риск бронхолегочной патологии у носителей различных аллельных вариантов гена *Pi* представлен на рис. 28.

С клинической точки зрения важно, что экспрессия гена *Pi* существенно зависит от множества факторов среды, изменяя легочную функцию и определяя течение целого ряда МФЗ бронхолегочной системы, включая хронические болезни легких, возникшие по другим причинам, а также профессиональные заболевания и инфекции (табл. 12).

Наиболее частый *Z*-аллель встречается только у европеоидов и исключительно редко среди негров и монголоидов. Замена глутаминовой кислоты (GAG) на лизин (AAG), наблюдаемая при наличии *PiZ*-аллеля, произошла около 6000 лет назад на севере Европы и встречается с частотой 5% в скандинавских странах, 4,5% — в Латвии, 4% — в Великобритании, 1,3% — в Южной Европе. *PiS*-аллель чаще встречается среди европейцев Южной Европы — до 10%, а Северной — до 5%. В среднем каждый житель Европы является гетерозиготным носителем *PiZ*- или *PiS*-аллеля. Предполагается, что достаточно широкое распространение дефицитных аллелей гена *Pi* может быть связано с повышенной частотой многоплодных беременностей и высокой фертильностью матерей — гетерозиготных носительниц.

Это моногенное заболевание (недостаточность  $\alpha_1$ -антитрипсина) упомянуто в разделе о МФЗ легких и бронхов по той причине, что недостаточность  $\alpha_1$ -антитрипсина играет большую роль в патогенезе заболевания легких. Имеет значение организация скрининга на недостаточность  $\alpha_1$ -антитрипсина (популяционное скринирование взрослых; скринирование групп риска, например, лиц, страдающих эмфиземой; скрининг новорожденных). Аргументом в пользу скрининга носителей «патологических» мутаций гена *Pi* является возможность лечения: заместительной (проластин), стимулирующей синтез и секрецию  $\alpha_1$ -антитрипсина из гепатоцитов (деназол, тамоксифен) терапии, а также хирургических методов лечения (трансплантация легких).



**Рис. 28.** Риск легочной патологии при различных аллельных вариантах и концентрациях  $\alpha_1$ -антитрипсина в сыворотке крови

Таблица 12

**Факторы риска, приводящие к более ранней и тяжелой манифестации легочных проявлений при недостаточности  $\alpha_1$ -антитрипсина**

Фактор риска	Комментарий
Курение	Главный фактор риска, приводящий к ухудшению легочной функции
Гиперактивность дыхательных путей	Приводит к ухудшению легочной функции, особенно у пациентов с бронхиальной астмой
Эпидемии острых респираторных заболеваний	Частые ОРЗ, особенно в детстве
Профессиональные вредности	Кадмиевая пыль, угольная пыль, неспецифические поллютанты
Загрязнение окружающей среды	У больных хроническими заболеваниями легких влияет на заболеваемость и смертность
Пассивное курение	Особенно у детей курящих родителей
Диета	Богатый рыбой рацион уменьшает риск
Возраст	Снижается легочная функция в процессе естественного старения, аддитивный эффект других факторов риска
Пол	Мужчины больше подвержены риску развития хронических болезней легких и бронхов

Среди МФЗ бронхолегочной системы наиболее распространенным и тяжелым является бронхиальная астма (БА), которой болеют в разных странах от 4 до 35% населения [Хайтов и др., 1998; Woolcock и Peat, 1997].

**Бронхиальная астма (БА)** — хроническое воспалительное заболевание дыхательных путей, характеризующееся периодическими приступами удушья с нормальным дыханием в межприступный период. БА обусловлена сложным взаимодействием иммунокомпетентных клеток, медиаторов, клеток и тканей бронхов, приводящим к острой бронхоконстрикции, отеку бронхиальной стенки, гиперсекреции слизи и перестройке бронхиального дерева.

В большинстве случаев БА является аллергическим (атопическим) заболеванием, что обуславливает ее развитие через IgE-зависимый ответ. Молекулярные и клеточные механизмы развития атопической астмы изучены довольно подробно (рис. 29).

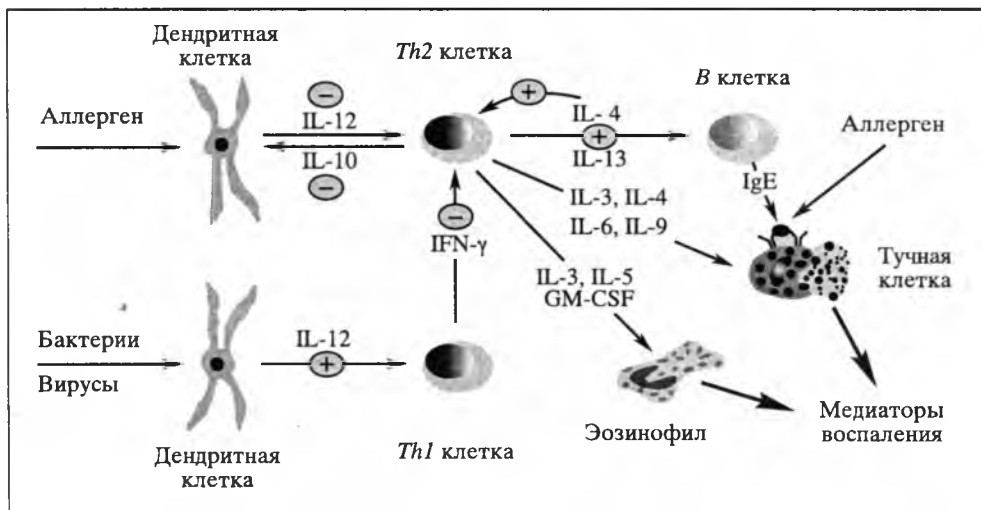
Аллергены, попадая с потоком воздуха в дыхательные пути, взаимодействуют с дендритными клетками слизистой бронхов. Результатом этого является реэкспрессия доминирующего эпитопа аллергена с молекулами HLA II на поверхности дендритных клеток. Связывание этого комплекса с рецепторами CD4 T-клеток стимулирует дифференцировку Th0-лимфоцитов в Th2, способных к секреции цитокинов, функция которых тесно связана с гуморальным иммунным ответом: ИЛ-3, -4, -5, -9, -13, GM-KCF.

При действии антигенов микобактерий и некоторых вирусов CD4-клетки превращаются в Th1-лимфоциты, секретирующие ИЛ-2, интерферон- $\gamma$  (Ифн- $\gamma$ ) и фактор некроза опухолей. Это приводит к активации макрофагов и элиминации с их помощью патогенных микроорганизмов. Сдвиг в сторону Th2-ответа активируется ИЛ-4 и ингибируется ИЛ-12, Ифн- $\gamma$  и - $\alpha$ . Th1-ответ требует высвобождения ИЛ-12 макрофагами и дендритными клетками и супрессии ИЛ-10 [Paul, Seder, 1994].

Цитокины, высвобождаемые Th2-клетками, главным образом ИЛ-4 и -13, взаимодействуют со своими рецепторами на В-лимфоцитах, активируют транскрипцию генов локуса тяжелой цепи типа  $\epsilon$  иммуноглобулинов и индуцируют переключение изотипов с  $\mu$  на  $\epsilon$ . IgE, синтезируемый активированными В-клетками, связывается с высокоаффинным ( $Fc_{\epsilon}RI$ ) и низкоаффинным ( $Fc_{\epsilon}RII$ ; CD23) рецепторами тучных клеток (мастоцитов). Когда аллерген взаимодействует с IgE на мастоцитах,  $Fc_{\epsilon}RI$  инициирует серию внутриклеточных событий, приводящих к высвобождению медиаторов воспаления и хемокинов: гистамина, простагландинов, лейкотриенов, фактора активации тромбоцитов, дегранулированных протеаз и др. Медиаторы воспаления синтезируют также эозинофилы, активированные ИЛ-3, -5 и GM-KCF [Ricci et al., 1997].

Действуя в совокупности, эти факторы приводят к микроизменениям стенок воздухоносных путей, сокращениям гладкой мускулатуры бронхов, гиперсекреции слизи. Кроме того, цито- и хемокины, по крайней мере частично, ответственны за миграцию и активацию клеток воспаления, главным образом, эозинофилов, и, таким образом, вносят вклад в сохранение патологического процесса [Kita, Gleich, 1996].

Представленный вариант развития воспаления бронхиального дерева характерен только для атопической, или аллергической формы БА, называемой также «экзогенной», если считать внешнесредовой фактор причиной заболевания. Как альтернативу экзогенной БА — рассматривают «эндогенную», или криптогенную форму, для которой этиологический фактор либо неизвестен, либо не имеет от-



**Рис. 29.** Предполагаемые клеточные и молекулярные механизмы аллергии и астмы [по: Holgate S.T., 1999]

ношения к аллергическому механизму высвобождения медиаторов воспаления. Примером криптогенной астмы является аспириновая форма заболевания, причиной которой является дефект метаболизма соединений арахидоновой кислоты, вследствие которого прием аспирина и его аналогов вызывает выброс воспалительных медиаторов без участия иммунных процессов и образования антител [Суздальцева, 1999].

Ключевой особенностью персистирующей астмы, вне зависимости от типа, является состояние бронхиальной гиперреактивности (BHR), обозначающее повышенный бронхоконстрикторный ответ на различные физико-химические факторы, включая не только аллергены, к которым сенсibilизирован индивид, но и такие неспецифические стимулы, как холодный воздух и физическая нагрузка [Гриппи, 1997]. Формирование этого состояния связывают с обусловленной хроническим аллергическим воспалением перестройкой дыхательных путей, сопровождающейся их сужением, повышением васкуляризации, гипертрофией и гиперплазией гладкой мускулатуры бронхов. В результате происходят изменения нейрональной регуляции и повышение сократимости гладких мышц дыхательных путей [Broide et al., 1999].

Как и для любого другого МФЗ, при локализации на определенном хромосомном участке генетических детерминант БА используют два основных подхода: метод поиска генов-кандидатов и позиционное картирование. Учитывая сложность этиологии и патогенеза астмы, предполагают, что число генов-кандидатов заболевания достаточно велико [Пузырев и др., 1998; Bleecker, Meyers, 1997; Hall, 1999]. *A priori* можно выделить несколько групп таких генов (табл. 13):

1. Гены факторов антигенного распознавания и гуморального иммунного ответа. К ним относят прежде всего гены цитокинов (интерлейкины, интерфероны, факторы некроза опухолей и т. д.), а также гены рецепторов Т- и В-клеток и гены главного комплекса гистосовместимости.



2. Гены факторов воспаления, среди которых, видимо, большую важность для астмы имеют гены собственно медиаторов воспаления (гистамина, простагландинов, лейкотриенов) и ферментов их метаболизма, а также гены хемокинов и молекул межклеточной адгезии.

3. Гены рецепторов цитокинов и агентов воспаления, чьи белковые продукты осуществляют фиксацию внешних молекул-лигандов на клетках-мишенях.

4. Гены внутриклеточных сигнальных молекул. Это гены большой и гетерогенной группы белков, объединяемых в несколько семейств, которые осуществляют и контролируют трансдукцию сигнала лиганда на «чувствительные» генные локусы. К этой группе, видимо, можно отнести и факторы транскрипции, которые активируются при участии данных посредников.

5. Другие гены, функционально имеющие отношение к БА, которые невозможно однозначно отнести ни к одной из указанных групп. В их числе можно рассматривать, например, исследуемые отечественными учеными гены биотрансформации ксенобиотиков, в частности, *NAT2*, *CYP1A*, *GSTT1*, *GSTM1* [Ляхович и др., 2000; Макарова и др., 2000; Иващенко и др., 2001].

Вероятно, перечисленные здесь гены-кандидаты БА – лишь определенная часть в структуре ее генетической компоненты. Это может быть связано с тем, что существенные для развития заболевания гены еще не открыты. Идентифицировать участки, где могут располагаться такие гены, позволяет позиционное клонирование.

Среди локусов БА, установленных с помощью данного подхода, видимо, наибольшую важность имеют участки 5q31.1-33, 6p12-21.2, 11q12-13, 12q14-24.1, 13q12-22, 14q11-12, 16p12.1-11.2 (табл. 14). Во всяком случае, именно для них получены воспроизводимые результаты. Методической вершиной позиционного клонирования является «полногеномный» поиск генов, когда проводится анализ сцепления интересующего заболевания или признака с большим набором высокоинформативных генетических маркеров, равномерно распределенных по всему геному. В отношении БА и ассоциированных с ней признаков известно уже восемь таких исследований (табл. 15). Их результаты выявили ряд важных обстоятельств.

Подтверждено сцепление БА с локусами 5q23-33, 6p23-21, 11q13, 12q15-24.1, 13q12-22 [Ober et al., 1999; Wjst et al., 1999; Yokouchi et al., 2000]. Видимо, здесь расположены наиболее важные гены заболевания, контролирующие ключевые звенья его патогенеза. Кроме того, геномный скрининг установил еще около 10–15 хромосомных участков, сцепленных с БА. Эти данные свидетельствуют, что в развитие астматического синдрома включено множество различных генов, каждый из которых способен вносить небольшой вклад в общую генетическую базу заболевания.

Показано, что количество, а также относительная важность генов и эффектов окружающей среды или генов-модификаторов в развитии БА варьирует в зависимости от этнического фона. Эти различия могут лежать в основе межпопуляционной вариабельности заболеваемости астмой.

Наконец, получила подтверждение идея о различных молекулярных основах БА и атопии: как правило, локусы, сцепленные с БА *per se* или ВНР, не проявляли сцепления с уровнем IgE и наличием специфической сенсibilизации по данным кожного тестирования [Wjst et al., 1999].

## Гены-кандидаты атопической бронхиальной астмы

Ген	Хромосомная локализация	Название белкового продукта	MIM
<b>Гены факторов антигенного распознавания и гуморального иммунного ответа</b>			
<i>CSF1</i>	1p21-13	Макрофагальный колониестимулирующий фактор (М-КСФ)	120420
<i>IL10</i>	1q31-32	Интерлейкин-10 (ИЛ-10)	124092
<i>IL1A</i>	2q13	Субъединица ИЛ-1	147760
<i>IL1B</i>	2q13	Субъединица ИЛ-1	147720
<i>IL1RN</i>	2q13	Антагонист рецептора ИЛ-1	147769
<i>CD28</i>	2q33-34	Антиген Т-клеток	186760
<i>IL12A</i>	3p12-13.2	ИЛ-12А	161560
<i>IL2</i>	4q26-27	ИЛ-2	147680
<i>IL3</i>	5q31.1	ИЛ-3	147740
<i>IL4</i>	5q31.1	ИЛ-4	147780
<i>IL5</i>	5q31.1	ИЛ-5	147850
<i>IL9</i>	5q31.1	ИЛ-9	146931
<i>IL12B</i>	5q31.1	ИЛ-12В	161561
<i>IL13</i>	5q31.1	ИЛ-13	147683
<i>CSF2</i>	5q31.1	Гранулоцитарно-макрофагальный КСФ (ГМ-КСФ)	138960
<i>CD14</i>	5q31.1	Фактор дифференцировки моноцитов	158120
<i>TNFA</i>	6p21.3-21.1	Фактор некроза опухолей $\alpha$ (ФНО- $\alpha$ )	191160
<i>TNFB</i>	6p21.3-21.1	ФНО- $\beta$	153440
<i>LTB</i>	6p21.3-21.1	Лимфотоксин- $\beta$	600978
<i>HLA-B, -DR</i>	6p23-21	Антигены гистосовместимости	142830
			142860
<i>IL6</i>	7p21	ИЛ-6	147620
<i>TCRB</i>	7q35	$\beta$ -субъединица антигенного рецептора Т-клеток	186930
<i>IFNA</i>	9p23-22	Интерферон- $\alpha$ (Ифн- $\alpha$ )	147660
<i>FGF3</i>	11q13	Фактор роста фибробластов 3	164950
<i>IGIF (IL18)</i>	11q22.2-22.3	Фактор индукции Ифн- $\gamma$	600953
<i>IFNG</i>	12q14	Ифн- $\gamma$	147570
<i>IGF1</i>	12q15-24.1	Инсулиноподобный фактор роста 1	147440
<i>SCF (MGF)</i>	12q22	Фактор роста тучных клеток	184745
<i>TCRA</i>	14q11.2-12	$\alpha$ -субъединица антигенного рецептора Т-клеток	186880
<i>IGHE</i>	14q32-33	Тяжелая цепь IgE	147180
<i>CSF3</i>	17q11.2-12	Гранулоцитарный КСФ (Г-КСФ)	138970
<i>TGFBI</i>	19q13	Трансформирующий ростовой фактор $\beta$ -1	190180
<b>Гены медиаторов воспаления и сопутствующих факторов</b>			
<i>PAF</i>	—	Фактор активации тромбоцитов	—
<i>TBXA2</i>	—	Тромбоксан А2	—
<i>VCAM1</i>	1p32-22	Сосудистая молекула адгезии 1	192225
<i>SELE</i>	1q23	Селектин Е	131210
<i>SELP</i>	1q23	Селектин Р	173610
<i>EDN2</i>	1p34	Эндотелин 2	131241
<i>LTC4S</i>	5q35	Лейкотриен С4 синтаза	246530
<i>PAFAH</i>	6p21.2-12	Ацетилгидролаза фактора активации тромбоцитов	601690

Таблица 13 (продолжение)

Ген	Хромосомная локализация	Название белкового продукта	MIM
<i>EDN1</i>	6p24-23	Эндотелин 1	131240
<i>TAC1</i>	7q21-22	Тахикинин 1	162320
<i>NOS3</i>	7q35-36	Эндотелиальная синтаза окиси азота	163729
<i>ALOX5</i>	10q11.2	Арахидонат 5-липоксигеназа	152390
<i>TAC3</i>	12q13-21	Тахикинин 3	162330
<i>NOS1</i>	12q15-24.1	Нейрональная синтаза окиси азота	163731
<i>LTA4H</i>	12q22	Лейкотриен А4 гидролаза	151570
<i>ALOX5AP</i>	13q12	Фактор активации арахидонат 5-липоксигеназы	603700
<i>HRF</i>	13q12-14	Фактор высвобождения гистамина	600763
<i>ESD</i>	13q14.2-14.3	Эстераза D	133280
<i>ITGAL</i>	16p11.2	Интегрин $\alpha$ L	153370
<i>RANTES</i>	17q11.2-12	Специфический протеин р228 Т-клеток	187011
<i>EOTAXIN</i>	17q12-22	Фактор хемотаксиса эозинофилов	601156
<i>NOS2</i>	17q12-22	Индуцибельная синтаза окиси азота	163730
<i>ICAM2</i>	17q23-25	Межклеточная молекула адгезии 2	146630
<i>ICAM1</i>	19p13.3-13.2	Межклеточная молекула адгезии 1	147840
<i>EDN3</i>	20q13.2-13.3	Эндотелин 3	131242
<i>ITGB2</i>	21q22.3	Интегрин $\beta$ 2	600065

## Гены рецепторов медиаторов и факторов гуморального иммунитета

<i>CSF3R</i>	1p35-34.3	Рецептор к Г-КСФ	138971
<i>PTAFR</i>	1p35-34.3	Рецептор фактора активации тромбоцитов	173393
<i>TNFR2</i>	1p36.3-36.2	Рецептор 2 ФНО	191191
<i>IL6RA</i>	1q21	$\alpha$ -цепь рецептора ИЛ-6	147880
<i>FCER1A</i>	1q23	$\alpha$ -цепь высокоаффинного рецептора IgE	147140
<i>FCER1G</i>	1q23	$\gamma$ -цепь высокоаффинного рецептора IgE	147139
<i>IL1R1</i>	2q12	Рецептор ИЛ-1 типа 1	147810
<i>CCR3</i>	3p21	Рецептор хемокинов	601268
<i>CCR1</i>	3p21.3	Рецептор хемокинов	601159
<i>IL5RA</i>	3p26-24	$\alpha$ -цепь рецептора ИЛ-5	147851
<i>TACR3</i>	4q25	Рецептор тахикинина 3	162332
<i>GRL</i>	5q31.1-33	Рецептор глюкокортикоидов	138040
<i>ADRB2</i>	5q32-34	$\beta_2$ -адренергический рецептор	109690
<i>CSF1R</i>	5q33	Рецептор М-КСФ	164770
<i>IFNGR1</i>	6p23-24	Рецептор 1 Ифн- $\gamma$	107470
<i>IL2RA</i>	10p14-15	$\alpha$ -цепь рецептора ИЛ-2	147730
<i>FCER1B</i>	11q12-13	$\beta$ -цепь высокоаффинного рецептора IgE	147138
<i>IL10RA</i>	11q23	$\alpha$ -цепь рецептора ИЛ-10	146933
<i>TNFR1</i>	12q13.2	Рецептор 1 ФНО	191190
<i>HTR2A</i>	13q14-21	Рецептор серотонина	182135
<i>EDNRB</i>	13q22	Рецептор эндотелина типа B	131244
<i>IL4RA</i>	16p12.1-11.2	$\alpha$ -цепь рецептора ИЛ-4	147781
<i>FCAR</i>	19q13.4	Высокоаффинный рецептор IgA	147045
<i>TBXA2R</i>	19p13.3	Рецептор тромбксана А2	188070
<i>IFNGR2</i>	21q22.1	Рецептор 2 Ифн- $\gamma$	147569
<i>CSF2RB</i>	22q12.2-13.1	$\beta$ -цепь рецептора ГМ-КСФ	138981
<i>IL13RA1</i>	X	$\alpha_1$ -цепь рецептора ИЛ-13	300119
<i>IL2RG</i>	Xq13	$\gamma$ -цепь рецептора ИЛ-2	308380
<i>CYSLT1</i>	Xq13-21	Рецептор цистеинил лейкотриена	300201

Таблица 13 (окончание)

Ген	Хромосомная локализация	Название белкового продукта	MIM
<i>IL13RA2</i>	Xq13.1-28	$\alpha_2$ -цепь рецептора ИЛ-13	300130
<i>CSF2RY</i>	Xp22.32, Yp11.3	$\alpha$ -цепь рецептора ГМ-КСФ	425000
<i>IL9R</i>	Xq28, Yq12	Рецептор ИЛ-9	300007
<b>Гены факторов транскрипции</b>			
<i>JAK1</i>	1p31.3	ЯК-тирозиновая киназа 1	147795
<i>STAT1</i>	2q32.2-32.3	Трансммиттер сигнала и активатор транскрипции 1	600555
<i>JAK2</i>	9p24	ЯК-тирозиновая киназа 2	147796
<i>NFKB2</i>	10q24	Субъединица 2 ядерного фактора транскрипции $\kappa$ B	164012
<i>STAT6</i>	12q14.3-24.1	Трансммиттер сигнала и активатор транскрипции 6	601512
<i>NFYB</i>	12q22-23	$\beta$ -субъединица ядерного фактора транскрипции Y	189904
<i>STAT5A</i>	13q	Трансммиттер сигнала и активатор транскрипции 5A	601511
<i>NFKB1</i>	14q11.2-13	Субъединица 1 ядерного фактора транскрипции $\kappa$ B	164011
<i>STAT5B</i>	17q11.2	Трансммиттер сигнала и активатор транскрипции 5B	604260
<i>JAK3</i>	19p13.1	ЯК-тирозиновая киназа 3	600173
<i>TYK2</i>	19p13.2	Тирозинкиназа 2	176941
<b>Другие гены</b>			
<i>GSTM1</i>	1p13.3	Глутатион S-трансфераза $\mu$ -1	138350
<i>CTLA4</i>	2q31-32	Антиген 4, ассоциированный с цитотоксическими Т-клетками	123890
<i>BCL6</i>	3q27	Протеин лимфомы В-клеток 6	109565
<i>MUC7</i>	4q13-21	Муцин 7	158375
<i>CFTR</i>	7q31.2	Трансмембранный регуляторный белок муковисцидоза	602421
<i>NAT2</i>	8p23.1-21.3	Ариламин N-ацетилтрансфераза 2	243400
<i>TLR4</i>	9q32-33	Toll-подобный рецептор 4	603030
<i>HTm4</i>	11q13	Трансмембранный протеин 4, специфичный для гематопоэтических клеток	—
<i>CC16</i>	11q12-13	Утероглобин (Бластокинин)	192020
<i>AC, ACT</i>	14q32	Ингибиторы протеаз	107280
<i>CYP1A1</i>	15q22-24	Цитохром P450	108330
<i>GSTT1</i>	22q11.2	Глутатион S-трансфераза $\theta$ -1	600436

Примечание. MIM — номер по каталогу V.A. McKusick «Mendelian Inheritance in Man» (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM>). В таблице приведены только наиболее важные гены-кандидаты астмы, так как по некоторым оценкам их число составляет около 1900.

Таблица 14

## Позиционно клонированные локусы бронхиальной астмы

Хромосома	Гены-кандидаты	Литература
5q31.1-33	<i>IL3, -4, -5, -9, -12B, -13, GM-CSF, CSF1R, ADRB2, CD14, LTC4S</i>	Postma et al., 1995; Turki et al., 1995; Gao et al., 1999
6p12-21.2	<i>HLA-B, -DR, TNFA, TNFB, LTB, PAFAH</i>	Campbell et al., 1996; Moffatt, Cookson, 1997; Kruse et al., 2000
11q12-13	<i>FCER1B, CC16, HTm4</i>	Sandford et al., 1993; Shirakawa et al., 1994; Laing et al., 1998
12q14-24.1	<i>IFNG, IGF1, SCF (MGF), NFYB, LTA4H, NOS1</i>	Barnes et al., 1996; Nickel et al., 1997; Wilkinson et al., 1998; Grasemann et al., 1999
13q12-22	<i>HTR2A, ESD, HRF, ALOX5AP, EDNRB, STAT5A</i>	Mao et al., 1996; Kimura et al., 1999
14q11-12	<i>TCRA/D</i>	Moffatt et al., 1994
14q32	<i>AC, ACT</i>	Malerba et al., 1999
16p12.1-11.2	<i>IL4RA</i>	Hershey et al., 1997; Deichmann et al., 1998; Mitsuyasu et al., 1998
19q13-19p13.3	<i>TGFB1, TBXA2R</i>	Rosenwasser, Borish, 1997; Unoki et al., 2000
Xq28/Yq12	<i>IL9R</i>	Holroyd et al., 1998; Kauppi et al., 2000

Полногеномный поиск генов предрасположенности к БА проведен также у мышей, имеющих фенотипически сходные с астмой признаки: воспаление дыхательных путей, инфильтрацию эозинофилов и неспецифическую бронхиальную гиперреактивность [Zhang et al., 1999]. В результате было установлено сцепление «астмы» с пятью генными локусами, причем четыре из них соответствуют гомологичным хромосомным областям, где локализованы гены-кандидаты заболевания у человека: 5q31, 6p21, 12q22-24, 17q12-22.

**Полиморфизм генов-кандидатов астмы**

Исходя из современных знаний о природе МФЗ, предполагается, что совокупность генов, отвечающих за предрасположенность к ним, образуют сеть связанных между собой элементов, результат взаимодействия которых на уровне белковых продуктов определяет биохимическую (метаболическую) индивидуальность человека. В зависимости от этого у индивидуума формируется присущая ему высокая или низкая степень предрасположенности к тому или иному заболеванию, которая в случае действия соответствующих факторов внешней среды приводит к развитию патологии. Таким образом, для понимания наследственных основ БА, как и других МФЗ, необходимо установить, какое именно «неблагоприятное» сочетание полиморфных вариантов генов подверженности приводит к высокой вероятности развития патологии при прочих равных условиях.

Таблица 15

**Структура геномных поисков генов предрасположенности к БА и сопутствующим  
клиническим фенотипам**

Исследовательские группы	Этнические группы, популяции	Число информативных семей	Методы статистического анализа	Число использованных STR-маркеров	Фенотипы
Daniels S.E. et al., 1996, Великобритания, Австралия	Европейцы	80 семей, 172 sibсовы пары	ASP, IBD	269	Атопия, IgE, аллергия, эозинофилы крови, легочная функция
The Collaborative Study on the Genetics of Astma (CSGA), 1997, США	Европейцы, афроамериканцы, латиноамериканцы	140 семей (79, 43, 18 соответственно)	IBS, много-точечный анализ сцепления	360	Астма
Hizawa N. et al. (CSGA), 1998, США	Европейцы, афро-американцы	45 ( $n = 299$ ) и 53 ( $n = 281$ ) семьи, соответственно	Непараметрический много-точечный анализ сцепления	370	Специфический IgE к <i>D. Pteronissinus</i>
Koppelman G.H. et al., 1998, Голландия, США	Голландцы	141 семья	Много-точечный анализ сцепления	Weber set 8	Астма, BHR, IgE
Ober C. et al., 1998, США	Гаттериты (США)	3 большие родословные ( $n = 361$ )	Тест уровня правдоподобия, TDT	295	Астма, BHR
Ober C. et al., 1999, США	Гаттериты (США)	64 родословные ( $n = 647$ )	TDT	295	Аллергопробы
Wjst M. et al., 1999, Германия	Немцы	97 семей ( $n = 415$ )	Непараметрический много-точечный анализ сцепления	Более 400	Астма, аллергия, эозинофилы крови, легочная функция
Yokouchi Y. et al., 2000, Япония	Японцы	47 семей, 65 sibсовых пар	Много-точечный анализ сцепления	398	Астма

В настоящее время получены данные о связи астмы и ассоциированных с заболеванием признаков полиморфизма примерно для половины генов, представленных в табл. 14. Объем настоящей главы не позволяет даже кратко коснуться всех этих исследований. Поэтому здесь мы представим результаты работ, касающихся лишь очень небольшого числа генов БА, для которых получены наиболее интересные данные, позволяющие говорить об этих генах уже не как о кандидатах, а как о генах предрасположенности, чей вклад в формирование наследственной компоненты заболевания можно считать доказанным.

***FCER1B***. Этот ген расположен в первом регионе, для которого было показано сцепление с БА, — 11q13. Белок, кодируемый этим геном,  $Fc_\epsilon RI-\beta$ , является составной частью высокоаффинного рецептора к IgE на тучных клетках, базофилах, моноцитах, клетках Лангерганса, который играет центральную роль в IgE-зависимом аллергическом ответе, метаболизме IgE, дифференцировке и росте мастоцитов и В-лимфоцитов. Высказано предположение, что молекулярные варианты  $Fc_\epsilon RI-\beta$  могут благоприятствовать развитию атопического состояния посредством либо усиления высвобождения медиаторов воспаления тучными клетками, либо стимуляции экспрессии ИЛ-4 и CD40-лиганда [Hopkin, 1996].

Прямым секвенированием в экзоне 6 гена *FCER1B* были обнаружены миссенс мутации Leu181Ile и Leu183Val, причем аллели Leu181 и Val183 часто встречались в тандеме. В случайной выборке неродственных лиц из Англии авторы исследования нашли достоверную ассоциацию аллеля Leu181 с высоким общим IgE и положительными аллергопробами к пыльце растений. Данные относительно значимости Leu181 в развитии атопии, полученные в Великобритании, были подтверждены при исследовании австралийской популяции [Shirakawa et al., 1996].

Недавно был найден еще один вариант гена *FCER1B*. Замена Glu237Gly в соответствующем белке ассоциируется у австралийцев с положительными аллергопробами к пыльце растений и антигенам клеща домашней пыли, а также с реакцией (BHR) на метахолин [Hill, Cookson, 1996]. Риск развития астмы у индивидов с данной заменой был в 2,3 раза выше по сравнению с контрольной группой без мутации ( $p < 0,05$ ).

При исследовании японской популяции вариант Glu237Gly показал существенную ассоциацию с атопической, но не с криптогенной астмой, а аллель Gly237 был достоверно связан с высоким уровнем общего IgE [Shirakawa et al., 1996].

**Гены интерлейкинов и их рецепторов.** Интерлейкины (ИЛ) играют существенную роль в контроле всех стадий развития и поддержания аллергических реакций и воспаления, поэтому анализ регуляции их активности имеет очень большое значение для понимания молекулярных основ патогенеза БА. С точки зрения генетики, интересным фактом оказалось то, что гены наиболее важных в развитии астмы интерлейкинов (ИЛ-4, -5, -9, -13) расположены тандемом в одном кластере на хромосоме 5 (5q31-33). В некоторых исследованиях было установлено сцепление БА и ассоциированных признаков с этим локусом [Postma et al., 1995]. Поэтому гены *IL*, картированные в регионе 5q31-33, становятся привлекательным объектом исследований по поиску наследственных факторов предрасположенности к астме.

На сегодняшний день нет убедительных данных о взаимосвязи полиморфизма гена *IL-4* с БА, хотя исследования, проведенные в НИИ медицинской генети-

ки (г. Томск), выявляют статистически значимую ассоциацию тяжести течения заболевания с гаплотипом G+717/C-590 этого гена. В то же время существенная роль в развитии предрасположенности к atopической астме гена  $\alpha$ -цепи рецептора к ИЛ-4 (*IL4RA*) установлена во многих работах. Выявлено, что гаплотип Gln551/Ser478, а также аллель *Ile50* этого гена существенно увеличивают способность рецептора к взаимодействию с внутриклеточным активатором транскрипции STAT6 и ассоциированы с повышенной концентрацией IgE *in vitro* и *in vivo* [Kruse et al., 1999]. Описаны ассоциации этих полиморфизмов с atopией и уровнем общего и специфического IgE [Mitsuasu et al., 1999; Ober et al., 2000].

В то время как ИЛ-4 способствует развитию аллергии, ИЛ-5 необходим для индукции и поддержания эозинофильного воспаления, приводящего к обструкции и гиперреактивности дыхательных путей. В настоящее время известен только один полиморфизм гена *IL5*: транзигция C-703T. Исследования, проведенные на выборке из 75 семей в НИИ медицинской генетики (г. Томск), показали сильную ассоциацию аллеля C-703 с БА, ВНР и atopией. Кроме того, установлена взаимосвязь этой формы гена с чувствительностью бронхов к метахолину (показатель неспецифической реактивности дыхательных путей).

В том же исследовании показана взаимосвязь аллеля T113 гена *IL9* с ВНР и параметрами функционирования легких. До этого подобные эффекты гена были установлены только у мышей [Nicolaidis et al., 1997]. Основной «точкой приложения» ИЛ-9 служат тучные клетки, являющиеся наряду с эозинофилами основными поставщиками медиаторов воспаления. С этих позиций становится понятным возможный молекулярный механизм ассоциации аллеля гена *IL9* с ВНР – следствием развития воспаления в дыхательных путях.

**ADRB2.** На хромосоме 5 в локусе 5q32-34 поблизости от кластера генов интерлейкинов расположен ген *ADRB2*, кодирующий  $\beta_2$ -адренергический рецептор, который локализован на гладкомышечных клетках бронхов, нейтрофилах, эозинофилах и макрофагах; стимуляция этого рецептора  $\beta_2$ -агонистами и циркулирующими катехоламинами приводит к дилатации дыхательных путей. Изменение функциональной активности рецептора зафиксировано у экспериментальных животных моделей и у людей с тяжелой астмой.  $\beta_2$ -адренергический рецептор играет важную роль в контрактильности дыхательных путей, поэтому мутации кодирующего его гена могут вносить вклад в развитие астмы. В кодирующей части гена *ADRB2* идентифицировано девять полиморфизмов, из которых четыре приводят к аминокислотным заменам в белковой последовательности: Val34Met, Arg16Gly, Gln27Glu, Thr164Ile. Было показано, что аллель *Gly16* достоверно ассоциирован с ночной астмой и ВНР, а вариант рецептора *Glu27* связан с пониженной чувствительностью дыхательных путей к метахолину [Turki et al., 1995].

**PAFAN.** Этот ген кодирует фермент ацетилгидролазу, которая участвует в деградации фактора активации тромбоцитов (ФАТ). ФАТ представляет собой фосфолипид, ингибирующий апоптоз В-клеток и включенный в активацию таких провоспалительных клеток, как тромбоциты, нейтрофилы и макрофаги. Кроме того, ФАТ индуцирует бронхоконстрикцию. Показано обратимое с помощью иммунотерапии повышение уровня ФАТ во время приступов астмы у детей. Ацетилгидролаза является функциональным антагонистом ФАТ; у пациентов с астмой отмечена существенная нехватка этого фермента [Kruse et al., 2000]. В связи с этим, *PAFAN* рассматривается как важный ген-кандидат в развитии БА. В этом



гене было идентифицировано несколько мутаций, приводящих к аминокислотным заменам. Две из них, Ile198Thr и Ala379Val, оказались ассоциированы с концентрацией IgE, атопической астмой и специфической сенсibilизацией к распространенным аллергенам у европеоидов [Kruse et al., 2000]. Две другие миссенс-мутации, Val279Phe и Gln281Arg, были ассоциированы с тяжестью течения астмы у японцев [Stafforini et al., 1999]. Опыты по кинетике ренатурации показали, что основой этих ассоциаций явилось обусловленное указанными мутациями снижение аффинности ФАТ-ацетилгидролазы к своему субстрату, приводящее к накоплению ФАТ, следствием чего является повышенный риск развития астмы.

**Гены биотрансформации.** Это большая группа генов, кодирующих ферменты деградации эндогенных и экзогенных веществ, токсичных для организма (ксенобиотики, продукты метаболизма арахидоновой кислоты, биогенные амины и т.д.). Полиморфизм некоторых из этих генов и их связь с БА активно изучается у нас в стране двумя исследовательскими группами: в Институте акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта (Санкт-Петербург) и Институте молекулярной биологии и биофизики (Новосибирск).

Исследования показали, что так называемые «нулевые» аллели генов *GSTT1* и *GSTM1*, а также полиморфные варианты генов *NAT2* и *CYP1A1*, кодирующие ферменты биотрансформации, являются существенными факторами риска БА. Они определяют индивидуальную способность к детоксикации ксенобиотиков (в частности, компонентов табачного дыма), являющихся триггерами заболевания, а также способность к деструкции медиаторов воспаления: лейкотриенов, простагландинов и т.д. [Ляхович и др., 2000; Макарова и др., 2000; Баранов и др., 2000; Иващенко и др., 2001].

*Генетика БА – одна из сложнейших проблем науки.* Усилия ученых всего мира уже около ста лет направлены на изучение наследственной основы этой болезни. Как и многие другие МФЗ, астма – трудный объект для генетических исследований. Широкий клинический полиморфизм, сложность этиологии и патогенеза, генетическая гетерогенность, неясный характер наследования, отсутствие четких критериев диагностики – вот далеко не полный перечень трудностей, с которыми встречаются «охотники за генами» БА. Несмотря на то, что уже определены, по-видимому, основные локусы заболевания и установлен приблизительный перечень генов, полиморфизм которых может оказаться существенным для его развития, до понимания целостной картины взаимодействия генетических и средовых факторов, приводящего к данному патологическому состоянию, все еще далеко. Необходим анализ ключевых элементов, индукторов молекулярных процессов, приводящих в конечном итоге к характерным для астмы обструктивным изменениям и воспалениям дыхательных путей. В этой связи, возможно, изучение генов цитокинов, HLA и TCR-комплексов, факторов активации клеток воспаления позволит установить именно те составляющие, чей вклад в детерминацию наследственной предрасположенности к астме особенно высок.

Ясно, что для столь сложного заболевания как БА, большую роль играют не столько отдельные аллели генов, сколько их сочетания, «генетические ансамбли». Такие сочетания могут быть неодинаковы в популяциях, приводя к различной степени распространенности этой патологии у разных народов. Поэтому перспективными направлениями исследований генетических основ БА являются

ся изучение вкладов конкретных генетических ансамблей в предрасположенность к болезни; расширение патогенетически важных количественных признаков (биохимических, иммунологических, психофизиологических) для оценки плейотропных эффектов изучаемых генов; массовый скрининг генов-кандидатов, отвечающих за развитие заболевания, в популяциях с различной частотой БА. Генетический анализ информативных семей с БА в таких популяциях может быть эффективным для обнаружения новых генов предрасположенности к болезни.

## Туберкулез

Это заболевание является проблемой мирового масштаба. По данным ВОЗ, одна треть населения мира инфицирована *Mycobacterium tuberculosis*. В 1998 г. было зарегистрировано 8 млн новых случаев клинического туберкулеза и 1,9 млн смертей от заболевания. Ожидается, что к 2010 г. в мире будет около 1 млрд вновь инфицированных, более 200 млн заболевших, а 70 млн – умрет от туберкулеза [Zumla, Grange, 1998].

В России ежегодно инфицируется более 9 тыс. детей (что на порядок выше, чем в других развитых странах), а число больных в 1997 г. по сравнению с 1991 г. выросло в 2,5 раза [Шевченко, 2000].

Отметим, что не все индивиды после контакта с *M. tuberculosis* становятся инфицированными. Клинические признаки туберкулеза проявляются только у 10% инфицированных. В настоящее время стало понятно, что развитие инфекции *M. tuberculosis* и клинический туберкулез обусловлены сложным взаимодействием между биологическими свойствами самого инфекционного агента, средовыми факторами и физиологической индивидуальностью человека [Hill, 1998].

У большинства людей сразу же после инфекции *M. tuberculosis* развивается эффективный иммунный ответ, ограничивающий распространение агента. Менее 10% инфицированных, у которых развивается заболевание, имеют идентифицируемые факторы риска, такие как диабет, СПИД, пожилой возраст и т.д. У остальных заболевших развитие туберкулеза, по-видимому, обусловлено комплексным взаимодействием генетических и средовых факторов [Bellamy et al., 1998].

Понимание важной роли генетических факторов в развитии туберкулеза пришло в первую очередь из эпидемиологических и близнецовых исследований. Так, в нескольких работах было показано, что степень устойчивости к инфекции *M. tuberculosis* у человека коррелирует с регионом его происхождения – предки более предрасположенных к заболеванию индивидов чаще всего происходили из областей, где туберкулез не распространен. Кроме того, частота клинического туберкулеза особенно высока во время эпидемий в популяциях, ранее не встречавшихся с данной инфекцией, в частности, у американских и канадских индейцев.

Исследования близнецов показали более высокий уровень конкордантности по клиническому туберкулезу у монозиготных пар по сравнению с дизиготными.

Дальнейшие исследования, проведенные на экспериментальных животных моделях, существенно дополнили имеющуюся информацию о генетических факторах предрасположенности к заболеванию. Исследования на мышах показали, что восприимчивость к инфекции такими родственными *M. tuberculosis* аген-

тами как *M. bovis* (BCG), *M. lepraemurium*, *M. intracellulare* и *M. avium*, а также двумя немикобактериальными видами *Salmonella typhimurium* и *Leishmania donovani*, контролируется одним геном, локализованным в проксимальном регионе мышиной хромосомы 1. Ген получил три альтернативных названия *Lsh*, *Ity* и *Bcg*. У мышей предрасположенность к инфекции, контролируемая этим геном, является рецессивным признаком по сравнению с устойчивостью. Показано, что ген *Lsh/Ity/Bcg* важен для активации макрофагов ретикулоэндотелиальной системы.

Ген *Bcg* был изолирован у мышей методом позиционного клонирования в 1993 г. и получил название *Nramp1* (natural-resistance associated macrophage protein; сейчас называется *Nramp1* в связи с открытием гомолога *Nramp2*). Анализ последовательности *Nramp1* у 27 инбредных линий мышей показал, что чувствительность к микобактериальной инфекции ассоциирована с миссенс мутацией, приводящей к замене глицина на аспарагиновую кислоту во втором трансмембранном домене белка [Vidal et al., 1993].

В 1994 г. был клонирован гомолог гена *Nramp1* у человека, названный *NRAMP1*. Он локализован в локусе 2q35 и содержит 16 экзонов [Cellier et al., 1994]. Вклад данного гена в предрасположенность к туберкулезу у человека активно дискутируется. Опубликованы доказательства сцепления региона 2q35 с заболеванием у бразильцев и канадских аборигенов [Shaw et al., 1997; Greenwood et al., 2000]. Показано, что данный локус отвечает за скорость прогрессирования заболевания, а не за восприимчивость к инфекции. Кроме того, установлено, что *NRAMP1* ассоциирован с проказой и результатами реакции Матсуда (аналог туберкулиновой пробы для проказы) у вьетнамцев. Это свидетельствует о том, что данный ген включен также в контроль инфекции близкородственной *M. tuberculosis* бактерии *M. leprae* [Abel et al., 1998].

В гене *NRAMP1* идентифицировано более десятка точечных и микросателлитных полиморфизмов. При исследовании методом случай-контроль в Гамбии (Западная Африка) показана существенная ассоциация двух точечных замен, делеционно-инсерционного и микросателлитного полиморфизма с клиническим туберкулезом. Особенно высокой была корреляция для SNP в интроне 4 гена и делеционно-инсерционного полиморфизма в 3'-UTR регионе [Bellamy et al., 1998]. В данном исследовании не было возможности определить, предрасполагает ли *NRAMP1* к большей восприимчивости к инфекции *M. tuberculosis* или прогрессированию туберкулеза, однако авторы склонились к последнему предположению и постулировали «главное» действие гена.

Функция *Nramp1* у мышей и *NRAMP1* у человека пока неизвестна. Белок *Nramp1* у мышей локализован в эндоцитозных компартментах и после фагоцитоза накапливается на мембранах фаголизосом. Эти данные свидетельствуют о том, что *Nramp1* может ограничивать воспроизводство внутриклеточных патогенов, изменяя фаголизосомальное содержимое. Родственный ген — *Nramp2* — контролирует уровень ионов железа, а дрожжевой гомологичный ген *SMF1* регулирует концентрацию ионов марганца. Таким образом, возможная функция белка *Nramp1* состоит в регуляции содержания ионов железа, марганца и других дивалентных катионов в фагосомах. Функция человеческого гомолога, по-видимому, такая же [Cannone-Hergaux et al., 1999; Jabado et al., 2000].

Опубликованы исследования и других генов, ответственных за предрасположенность к туберкулезу у человека. Так, у жителей Камбоджи была показана ас-

социация аллеля *HLA-DQB1\*0503 II* с заболеванием. Во многих популяциях предрасположенность к проказе ассоциирована с *HLA-DR2*. С проказой ассоциирован также полиморфизм в области промотора гена *TNFA*.

Показано, что с туберкулезом связаны три точечные замены в гене белка, связывающего маннозу (*MBL*). Причем частота этих вариантов была достаточно высока как у европеоидов, так и у африканцев и австралийских аборигенов [Bellamy, 2000; Turner et al., 2000].

В последнее время получены доказательства связи туберкулеза с полиморфизмом гена рецептора к витамину D (*VDR*) [Wilkinson et al., 2000]. Показаны ассоциации с туберкулезом полиморфизма генов, кодирующих интерлейкин-1 $\beta$  (*IL1B*) и его рецепторный антагонист (*IL1RA*). Ведутся исследования также и других генов, рассматриваемых как кандидаты на роль генов предрасположенности к туберкулезу, исходя из их функции (*NOS2*, *TLR*, *NAT2*, *GST* и др.) [Kim et al., 2000].

Молекулярные основы предрасположенности к туберкулезу пока изучены недостаточно. Связь исследованных аллельных вариантов с заболеванием и их клинические проявления слишком слабы, их роль в функциональных нарушениях обоснована недостоверно. Таким образом, молекулярные основы генетического контроля предрасположенности к туберкулезу в больших популяциях остаются пока достаточно туманными.

Вместе с тем существуют четкие причинно-следственные отношения между редкими менделирующими иммунодефицитами по Т-клеткам или фагоцитам и тяжелыми формами туберкулеза. Пациенты с такими заболеваниями в значительной степени чувствительны к инфекции не только *M. tuberculosis*, но и другими микроорганизмами. Недавно был описан и исследован менделирующий синдром восприимчивости к микобактериальной инфекции (OMIM — 209950). Люди с этим синдромом исключительно чувствительны не только к патогенным штаммам, но и к слабовирулентным видам микобактерий, таким как свободноживущие нетуберкулезные формы и VCG. При исследовании этого синдрома обнаружены мутации в генах, связанных с противoinфекционным иммунитетом: *IFNG*, *IFGR1*, -2, *TNFA*, *IL12B*, *IL12RB1* (интерферон-гамма, два его рецептора, фактор некроза опухолей альфа, ИЛ-12 и бета-1 субъединица его рецептора) [Altare et al., 1998].

На основании имеющихся на сегодняшний день данных сформулировано предположение о непрерывном спектре генетического контроля предрасположенности к туберкулезу у человека: моногенные формы — варианты с эффектом главного гена (олигогенные формы) — полигенная подверженность [Abel, Casanova, 2000]. Прогресс в молекулярно-генетических исследованиях предрасположенности к заболеванию будет, вероятно, возможен только при комплексном анализе. Может привести к успеху изучение редких менделирующих дефектов иммунитета у отдельных пациентов с тяжелыми нераспространенными клиническими фенотипами, ведущих эффектов в отдельных семьях и в популяциях, лишь недавно столкнувшихся с микобактериальной инфекцией, а также широко распространенных полиморфизмов в популяциях с длительной историей экспозиции *M. tuberculosis*. Возможно, на всех трех уровнях генетического контроля участвует один ген, имеющий редкие мутации, ответственные за менделирующие тяжелые фенотипы, относительно редкие варианты, обуславливающие основной

эффект, и распространенные в популяциях полиморфизмы, в умеренной степени определяющие риск развития заболевания.

Поиск такого гена (генов) — на сегодняшний день актуальная задача. Кроме того, важным представляется изучение функционального полиморфизма известных генов-кандидатов туберкулеза в популяциях различного этнического состава с разной частотой заболевания.

## Литература

*Баранов В.С., Баранова Е.В., Иващенко Т.Э., Асеев М.В.* Геном человека и гены «предрасположенности». Введение в предиктивную медицину. СПб.: Интермедика, 2000. 271 с.

*Гриппи М.А.* Патофизиология легких. М.: Восточная книжная компания, 1997. 344 с.

*Иващенко Т.Э., Сиделева О.Г., Петрова М.А.* и др. Генетические факторы предрасположенности к бронхиальной астме // Генетика. 2001. Т. 37, № 1. С. 107–111.

*Ляхович В.В., Вавилин В.А., Макарова С.И.* и др. Роль ферментов биотрансформации ксенобиотиков в предрасположенности к бронхиальной астме и формировании особенностей ее клинического фенотипа // Вестн. РАМН. 2000. № 12. С. 36–41.

*Макарова С.И., Вавилин В.А., Ляхович В.В., Гавалов С.М.* Аллель NAT2\*5 — фактор устойчивости к заболеванию бронхиальной астмой у детей // Бюлл. эксп. биол. мед. 2000. Т. 129, № 6. С. 677–679.

*Пузырев В.П.* Медико-генетическое исследование населения приполярных регионов. Томск: Изд-во Томск.унив. 1991. 200 с.

*Пузырев В.П.* Состояние и перспективы геномных исследований в генетической кардиологии. // Вестн. РАМН. 2000. № 7. С. 28–33.

*Пузырев В.П.* Генетика артериальной гипертензии (современные исследовательские парадигмы) // Клиническая медицина. 2003. № 1. С. 12–18.

*Пузырев В.П., Огородова Л.М.* Геномная медицина в решении проблем пульмонологии // Вестн. РАМН. 2000. № 12. С. 45–48.

*Пузырев В.П., Огородова Л.М., Салюкова О.А.* Генетические основы этиопатогенеза бронхиальной астмы // Сиб. мед. журнал. 1998. № 3. С. 82–85.

*Сойфер В.Н.* Международный проект «Геном человека» // Соросовск. образ. журн. 1998. № 12. С. 4–11.

*Степанов В.А., Пузырев К.В., Спиридонова М.Г.* и др. Полиморфизм генов ангиотензин-превращающего фермента и эндотелиальной синтазы окиси азота у лиц с артериальной гипертензией, гипертрофией левого желудочка и гипертрофической кардиомиопатией // Генетика. 1998. Т. 34, № 11. С. 1578–1581.

*Суздальцева Т.В.* Иммунопатологические аспекты аспириновой индуцированной бронхиальной астмы // Аллергология. 1999. № 4. С. 16–18.

*Хаитов Р.М., Богова А.В., Ильина Н.И.* Эпидемиология аллергических заболеваний в России. // Иммунология. 1998. № 3. С. 4–9.

*Шевченко Ю.Л.* Значение социальных факторов во взаимодействии человека и микроорганизмов. Роль здравоохранения в профилактике и лечении инфекционных заболеваний // Вестн. РАМН. 2000. № 11. С. 7–11.

- Abel L., Casanova J.-L.* Genetic predisposition to clinical tuberculosis: bridging the gap between simple and complex inheritance // *Am. J. Hum. Genet.* 2000. Vol. 67. P. 274–277.
- Abel L., Sanchez F.O., Oberti J.* et al. Susceptibility to leprosy is linked to the human NRAMP1 gene // *J. Infect. Dis.* 1998. Vol. 177. P. 133–145.
- Altare F., Jouanguy E., Lamhamedi S.* et al. Mendelian susceptibility to mycobacterial infection in man // *Curr. Opin. Immunol.* 1998. Vol. 10. P. 413–417.
- Barnes K.C., Marsh D.G.* The genetics and complexity of allergy and asthma // *Immunol. Today.* 1998. Vol. 19. P. 325–332.
- Barnes K.C., Neely J.D., Duffy D.L.* et al. Linkage of asthma and total serum IgE concentration to markers on chromosome 12q: evidence from Afro-Caribbean and Caucasian populations // *Genomics.* 1996. Vol. 37. P. 41–50.
- Beasley R.* Worldwide variation in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis and atopic eczema // *Lancet.* 1998. Vol. 351. P. 1225–1232.
- Bellamy R.* Identifying genetic susceptibility factors for tuberculosis in Africans: a combined approach using a candidate gene study in a genome-wide screen // *Clin. Sci.* 2000. Vol. 98. P. 245–250.
- Bellamy R., Ruwende C., Corrah T.* et al. Variations in the NRAMP1 gene and susceptibility to tuberculosis in West Africans // *N. Engl. J. Med.* 1998. Vol. 338. P. 640–644.
- Benediktsson R., Lindsay R.S., Noble J.* et al. Glucocorticoid exposure in utero: new model for adult hypertension // *Lancet.* 1993. № 341. P. 339–341.
- Bleecker E.R., Meyers D.A.* Genetics of allergy and asthma // *Allergy and allergic diseases* / Ed. A.B. Kay. Blackwell Science: Oxford. 1997. P. 1196–1207.
- Boerwinkle E., Ellsworth D.L., Hallman M.* et al. Genetic analysis of atherosclerosis: a research paradigm for the common chronic disease // *Hum. Genet.* 1996. № 5. P. 1405–1410.
- Bonnardeaux A., Nadaud S., Charru A.* et al. Lack of evidence for linkage of the endothelial cell nitric oxide synthase gene to essential hypertension // *Circulation.* 1995. № 91. P. 96–102.
- Boomsma D.J., Frants R.R., Bank R.A., Martin N.S.* Protease inhibitor ( $P_1$ ) locus, fertility and twinning // *Hum. Genet.* 1992. Vol. 89. P. 329–332.
- Brahmajothi V., Pitchapann R.M., Kakkanaiah V.N.* et al. Association of pulmonary tuberculosis and HLA in South India // *Tubercle.* 1991. Vol. 72. P. 123–132.
- Broide D.H., Hoffman H., Sriramarao P.* Genes that regulate eosinophilic inflammation // *Am. J. Hum. Genet.* 1999. Vol. 65. P. 302–307.
- Campbell D.A., Li Kam Wa E., Britton J.* et al. Polymorphism at the tumor necrosis factor locus and asthma // *Monogr. Allergy.* 1996. Vol. 33. P. 125–137.
- Cannone-Hergaux F., Gruenheid S., Govoni G., Gros P.* The Nrampl protein and its role in resistance to infection and macrophage function // *Proc. Assoc. Am. Physicians.* 1999. Vol. 111. P. 283–289.
- Cellier M., Govoni G., Vidal S.* et al. Human natural resistance-associated macrophage protein: cDNA, chromosomal mapping, genomic organisation, and tissue-specific expression // *J. Exp. Med.* 1994. Vol. 180. P. 1741–1752.
- Chung K.F., Barnes P.J.* Cytokines in asthma // *Thorax.* 1999. Vol. 54. P. 825–857.
- Daniels S.E., Bhattacharya S., James A.* et al. A genome-wide search for quantitative trait loci underlying asthma // *Nature.* 1996. Vol. 383. P. 247–250.
- Deichmann K.A., Heinzmann A., Forster J.* et al. Linkage and allelic association of atopy and markers flanking the *IL4*-receptor gene // *Clin. Exp. Allergy.* 1998. Vol. 28. P. 151–155.
- Gao P.-S., Mao X.-Q., Baldini M.* et al. Serum total IgE levels and CD14 on chromosome 5q13 // *Clin. Genet.* 1999. Vol. 56. P. 164–165.

Goyette P., Sumner J.S., Milos R. et al. Human Methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification // Nat. Genet. 1994. № 7. P. 195–200.

Grasemann H., Yandava C. N., Drazen J. M. Neuronal NO synthase (*NOS1*) is a major candidate gene for asthma // Clin. Exp. Allergy. 1999. Vol. 29. Suppl. 4. P. 39–41.

Greenwood C.M.T., Fujiwara T.M., Boothroyd L.J. et al. Linkage of tuberculosis to chromosome 2q35 loci, including *NRAMP1*, in a large aboriginal Canadian family // Am. J. Hum. Genet. 2000. Vol. 67. P. 405–416.

Hall I.P. Genetics and pulmonary medicine: asthma // Thorax. 1999. Vol. 54. P. 65–69.

Halushka M.K., Fan J.-B., Bentley K. et al. Patterns of SNPs in candidate genes for blood-pressure homeostasis // Nature Genet. 1999. Vol. 22. P. 239–247.

Hershey G.K. K., Friedrich M.F., Esswein L.A. et al. The association of atopy with a gain-of-function mutation in the  $\alpha$  subunit of the interleukin-4 receptor // New Eng. J. Med. 1997. Vol. 337. P. 1720–1725.

Herzog R., Lutz S., Blin N. et al. Complete nucleotide sequence of the gene for human cofactor II and mapping to chromosomal band 22q11 // Biochemistry. 1991. № 30. P. 1350–1357.

Hill M.R., Cookson W.O.C.M. A new variant of the  $\beta$  subunit of the high-affinity receptor for immunoglobulin E (Fc $\epsilon$ RI- $\beta$  E237G): associations with measures of atopy and bronchial hyperresponsiveness // Hum. Molec. Genet. 1996. Vol. 5. P. 959–962.

Hill A. The immunogenetics of human infectious diseases // Ann. Rev. Immunol. 1998. Vol. 16. P. 593–617.

Hizawa N., Freidhoff L.R., Chiu Y.-F. et al. Genetic regulation of Dermatophagoides pteronissinus-specific IgE responsiveness: a genome-wide multi-point linkage analysis in families recruited through 2 asthmatic sibs // J. Allergy Clin. Immunol. 1998. Vol. 102. P. 436–442.

Holgate S. T. The epidemic of allergy and asthma // Nature. 1999. Vol. 402. Suppl. B2-4.

Holroyd K.J., Martinati L.C., Trabetti E. et al. Asthma and bronchial hyperresponsiveness linked to the XY long arm pseudoautosomal region // Genomics. 1998. Vol. 52. P. 233–235.

Hopkin J.M. Molecular genetics of the high affinity IgE receptor // Monogr. Allergy. 1996. Vol. 33. P. 97–108.

Jabado N., Jankowski A., Dougaparsad S. et al. Natural resistance to intercellular infections: natural resistance-associated macrophage protein 1 (*Nramp1*) functions as a pH-dependent manganese transporter at the phagosomal membrane // J. Exp. Med. 2000. Vol. 192. P. 1237–1248.

Jeunemaitre X., Lifton R.P., Hunt S.C. et al. Absence of linkage between the angiotensin converting enzyme locus and human essential hypertension // Nature Genet. 1993. № 1. P. 72–75.

Kauppi P., Laitinen T., Ollikainen V. et al. The *IL9R* region contribution in asthma is supported by genetic association in an isolated population // Eur. J. Hum. Genet. 2000. Vol. 8. P. 788–792.

Kim W.-J., Lee H.-L., Lee S.-C. et al. Polymorphisms of N-acetyltransferase 2, glutathione S-transferase *Mu* and *Theta* genes as risk factors of bladder cancer in relation to asthma and tuberculosis // J. Urol. 2000. V. 164. P. 209–213.

Kimura K., Noguchi E., Shibasaki M. et al. Linkage and association of atopic asthma to markers on chromosome 13 in the Japanese population // Hum. Mol. Genet. 1999. Vol. 8. P. 1487–1490.

- Kita H., Gleich G.J.* Chemokines active on eosinophils. Potential roles in allergic inflammation // *J. Exp. Med.* 1996. Vol. 183. P. 2421–2426.
- Kozich V., Kraus E., Franchis R.* et al. Hyperhomocysteinemia in premature arterial disease: examination of cystathionine beta-synthase alleles at the molecular level // *Hum. Molec. Genet.* 1995. № 4. P. 623–629.
- Koppelman G.H., Stine O.C., Howard T.D.* et al. Genome screen for asthma susceptibility loci in a restricted Dutch population // *Am. J. Hum. Genet.* 1998. Vol. 63. Suppl. A295.
- Kruse S., Japha T., Tedner M.* et al. The polymorphisms S503P and Q576R in the interleukin-4 receptor  $\alpha$  gene are associated with atopy and influence the signal transduction // *Immunology.* 1999. Vol. 96. P. 365–371.
- Kruse S., Mao X.-Q., Heinzmann A.* et al. The Ile198Thr and Ala379Val variants of plasmatic paf-acetylhydrolase impair catalytical activities and are associated with atopy and asthma // *Am. J. Hum. Genet.* 2000. Vol. 66. P. 1522–1530.
- Kutz T.W., Spence M.A.* Genetics of essential hypertension // *Am. J. Med.* 1993. № 94. P. 77–84.
- Laing I. A., Goldblatt J., Eber E.* et al. A polymorphism of the *CC16* gene is associated with an increased risk of asthma // *J. Med. Genet.* 1998. Vol. 35. P. 463–467.
- Malerba G., Patuzzo C., Trabetti E.* et al. Chromosome 14 linkage analysis for atopic asthma in Italian families, and mutation study of two serpin genes // *Am. J. Hum. Genet.* 1999. Vol. 65. Suppl. A434.
- Mao X.-Q., Morimoto K., Shirakawa T.* et al. Association between serotonin type 2 receptor (*HTR2*) and bronchial asthma in human // *J. Med. Genet.* 1996. Vol. 33. P. 525–528.
- Matsuo T., Kario K., Yamada T.* et al. Hereditary heparin cofactor II deficiency and coronary artery disease // *Tromb. Res.* 1992. № 65. P. 495–505.
- Mitsuyasu H., Yanagihara Y., Mao X.-Q.* et al. Dominant effect of Ile50Val variant of the human IL-4 receptor  $\alpha$ -chain in IgE synthesis // *J. Immunol.* 1999. Vol. 162. P. 1227–1231.
- Moffatt M.F., Hill M.R., Cornelis F.* et al. Genetic linkage of T-cell receptor  $\alpha/\delta$  complex to specific IgE responses // *Lancet* – 1994. – Vol. 343. P. 1597–1600.
- Moffatt M.F., Cookson W.O.C.M.* Tumor necrosis factor haplotypes and asthma // *Hum. Mol. Genet.* 1997. Vol. 6. P. 551–554.
- Morton N.E.* Significance levels in complex inheritance // *Am. J. Hum. Genet.* 1998. Vol. 62. P. 690–697.
- Nickel R., Wahn U., Hizawa N.* et al. Evidence for linkage of chromosome 12q15-q24.1 markers to high total serum IgE concentration in children of German Multicenter Allergy Study // *Genomics.* 1997. Vol. 46. P. 159–162.
- Nicolaidis N.C., Holroyd K.J., Ewart S.L.* et al. Interleukin 9: a candidate gene for asthma // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997. Vol. 94. P. 13175–13180.
- Nishina P.M., Johnson J.P., Nagget J.K.* et al. Linkage of atherogenic lipoprotein phenotype to the low density lipoprotein receptor locus on the short arm of chromosome 19 // *Ibid.* 1992. № 89. P. 708–712.
- Ober C., Cox N. J., Abney M.* et al. Genome-wide search for asthma susceptibility loci in a founder population // *Hum. Mol. Genet.* 1998. Vol. 7. P. 1393–1398.
- Ober C., Leavitt S. A., Tsalenko A.* et al. Variation in the interleukin 4-receptor  $\alpha$  gene confers susceptibility to asthma and atopy in ethnically diverse population // *Am. J. Hum. Genet.* 2000. Vol. 66. P. 517–526.



- Ober C., Tsalenko A., Willadsen S.* et al. Genome-wide screen for atopy susceptibility alleles in Hutterites // *Clin. Exp. Allergy*. 1999. Vol. 29. Suppl. P. 11–15.
- Orishi M., Fujii K., Minamino T.* et al. A potent genetic risk factor restenosis (Letter) // *Nature Genet.* 1993. № 5. P. 324–325.
- Paul W.E., Seder R.A.* Lymphocyte response and cytokines // *Cell*. 1994. Vol. 76. P. 241–251.
- Postma D.S., Bleecker E.R., Amelung P.J.* et al. Genetic susceptibility to asthma: bronchial hyperresponsiveness coinherited with a major gene for atopy // *N. Eng. J. Med.* 1995. Vol. 333. P. 894–900.
- Ricci M., Matucci A., Rossi O.* Pathogenetic mechanisms and genetic aspects of bronchial asthma // *ACI Intern.* 1997. Vol. 9. P. 141–148.
- Rosenwasser L.J., Borish L.* Genetics of atopy and asthma: the rationale behind promoter-based candidate gene studies (*IL-4* and *IL-10*) // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1997. Vol. 156. P. 152–155.
- Rotter J.I., Bu.X., Cantor R.M.* et al. Multilocus genetic determinants of LDL particle size in coronary artery disease families // *Am. J. Hum. Genet.* 1996. № 58. P. 585–594.
- Ruiz J., Blanche H., Cohen N.* et al. Insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene is strongly associated with coronary heart disease in non-insulin-dependent diabetes melitus // *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1994. № 91. P. 3662–3665.
- Sandford A.J., Shirakawa T., Moffatt M.F.* et al. Localization of atopy and  $\beta$  subunit of high-affinity IgE receptor (*Fc $\epsilon$ RI*) on chromosome 11q // *Lancet*. 1993. Vol. 341. P. 332–334.
- Shunkert H., Hense H.-W., Holmer S.R.* et al. Association between a deletion polymorphism of the angiotensin-converting-enzyme gene left ventricular hypertrophy // *New Eng. J. Med.* 1994. № 330. P. 1634–1638.
- Schwartz K.* On the pulse of genetic cardiology // *Nature Genet.* 1994. № 8. P. 110–111.
- Shaw M.A., Collins A., Peacock C.S.* et al. Evidence that genetic susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* in Brazilian population is under oligogenic control: linkage study of the candidate genes *NRAMP1* and *FNFA* // *Tuber. Lung. Dis.* 1997. Vol. 78. P. 35–45.
- Shirakawa T., Mao X.-Q., Sasaki S.* et al. Association between atopic asthma and a coding variant of *Fc $\epsilon$ RI $\beta$*  in a Japanese population // *Hum. Molec. Genet.* 1996. Vol. 5. P. 1129–1130.
- Stafforini D.M., Numao T., Tsodikov A.* et al. Deficiency of platelet-activating factor acetylhydrolase is a severity factor for asthma // *J. Clin. Invest.* 1999. Vol. 103. P. 989–997.
- The Collaborative Study on the Genetics of Asthma. A genome-wide search for asthma susceptibility loci in ethnically diverse populations // *Nature Genet.* 1997. Vol. 15. P. 389–392.
- Turki J., Pak J., Green S.A.* et al. Genetic polymorphisms of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor in nocturnal and non-nocturnal asthma: evidence that gly16 correlates with nocturnal phenotype // *J. Clin. Invest.* 1995. Vol. 95. P. 1635–1641.
- Turner M.W., Dinan L., Heatley S.* et al. Restricted polymorphism of the mannose-binding lectin gene of indigenous Australians // *Hum. Mol. Genet.* 2000. Vol. 9. P. 1481–1486.
- Unoki M., Furuta S., Onouchi Y.* et al. Association study of 33 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in 29 candidate genes for bronchial asthma: positive association a

T924C polymorphism in the tomboxane A2 receptor gene // *Hum. Genet.* 2000. Vol. 106. P. 440–446.

*Vidal S.M., Malo D., Vogan K.* et al. Natural resistance to infection with intercellular parasites: isolation of a candidate for Bcg // *Cell.* 1993. Vol. 73. P. 469–485.

*Wang X.L., Sim A.S., Badenhop R.F.* et al. A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene // *Nature Med.* 1996. № 2. P. 41–45.

*Wilkinson J., Grimley S., Collins A.* et al. Linkage of asthma to markers on chromosome 12 in a sample of 240 families using quantitative phenotype score // *Genomics.* 1998. Vol. 53. P. 251–259.

*Wilkinson R.J., Llewelyn M., Toossi Z.* et al. Influence of vitamin D deficiency and vitamin D receptor polymorphisms on tuberculosis among Gujarati Asians in west London: a case-control study // *Lancet.* 2000. Vol. 355. P. 618–621.

*Wjst M., Fischer G., Immervoll T.* et al. A genome-wide search for linkage to asthma // *Genomics.* 1999. Vol. 58. P. 1–8.

*Woolcock A.J., Peat J. K.* Evidence for the increase of asthma worldwide // *The rising trends in asthma* / Ed. D. Chadwick, G. Cadrew, J. Wiley, Sons, Chichester. 1997. P. 122–139.

*Yokouchi Y., Nukaga Y., Shibasaki M.* et al. Significant evidence for linkage of mite-sensitive childhood asthma to chromosome 5q31–33, near the interleukin 12 B locus by a genome-wide search in Japanese families // *Genomics.* 2000. Vol. 66. P. 152–160.

*Zhang Y., Lefort J., Kearsey V.* et al. A genome-wide screen for asthma-associated quantitative trait loci in a mouse model of allergic asthma // *Hum. Mol. Genet.* 1999. Vol. 8. P. 601–605.

*Zumla A., Grange J.* Tuberculosis // *Br. Med. J.* 1998. Vol. 316. P. 1962–1964.

### 3.3. МИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ БОЛЕЗНИ

*В.Б. Васильев*

Примерно 40 лет назад было открыто первое заболевание, связанное с разобщением окисления и фосфорилирования в митохондриях. С тех пор пристальный интерес исследователей и клиницистов неизменно вызывали так называемые «болезни окислительного фосфорилирования» (*OxPHOS diseases*), отличающиеся тяжелой симптоматикой, и часто с неблагоприятным исходом. В настоящее время известно около 200 нозологических единиц и синдромов. Эти синдромы наследуются по материнской линии, поскольку все они вызваны структурными нарушениями в ДНК митохондрий (при слиянии отцовской и материнской зародышевых клеток человеческого организм получает почти все митохондрии из яйцеклетки).

Особенностью наследственных митохондриальных болезней является полное отсутствие каких-либо патологических признаков в первые годы жизни человека. Это вызвано наличием в клетках растущего организма сотен митохондрий как с мутантной, так и с нормальной ДНК, что получило название *гетероплазмии*. Количество митохондрий с мутантной мтДНК увеличивается постепенно. Благодаря этому «лаг-периоду» будущие пациенты могут достигать половозрелого воз-

раста и давать потомство, несущее те же мутации в мтДНК. Когда содержание мутантных копий мтДНК, неспособных кодировать тРНК или белковые цепи ферментов, достигает в клетке некоего «порога концентрации», энергетический метаболизм оказывается недостаточным для потребностей организма, что и проявляется в виде заболевания с симптомами дегенерации разных органов.

Сегодня уже установлена природа мутаций, вызывающих ряд болезней ОХРОС. Это могут быть как точковые мутации, так и обширные делеции, затрагивающие сразу несколько генов. Тем не менее, до сих пор не найдено ответа на многие вопросы, связанные с молекулярными механизмами, обеспечивающими возникновение и развитие разнообразных симптомов этих тяжелых заболеваний.

## Некоторые структурные и функциональные особенности митохондрий

За 165 лет, прошедших со времени первых наблюдений митохондрий в поперечно-полосатых мышцах, было однозначно установлено, что эти органеллы эукариотических клеток (получившие свое название от греческих слов *mitos* — нить и *chondros* — зерно), ответственны за функцию тканевого дыхания и синтез АТФ, происходящий благодаря сопряжению окисления и фосфорилирования. Хотя в некоторых высокоспециализированных тканях (например, летательная мускулатура насекомых) их роль действительно ограничена почти исключительно выработкой энергии, в подавляющем большинстве клеток различных организмов митохондрии выполняют много других важных функций. Они синтезируют аминокислоты, пиримидины, липиды, гем, витамины, окисляют жирные кислоты, осуществляют важнейшие этапы метаболизма. Обеспечение столь замечательного функционального разнообразия стоит клетке довольно дорого. Достаточно сказать, что из примерно  $10^4$  различных полипептидов, синтезируемых типичной эукариотической клеткой, около  $10^3$  можно обнаружить в митохондриях, т.е. 10% клеточных белков — это белки митохондриальные. Небольшая по размерам ДНК митохондрии (мтДНК) кодирует всего 13 полипептидов, входящих в состав четырех из пяти ферментных комплексов дыхательной цепи. Все остальные полипептиды кодируются ядерными генами, синтезируются на рибосомах цитоплазмы и затем транспортируются в одно из четырех структурных образований митохондрии: наружную мембрану, межмембранное пространство, внутреннюю мембрану или матрикс. В некоторых эукариотических клетках до 10% генов ядра прямо или косвенно участвуют в биогенезе митохондрий [Schatz, 1994].

В 1950-е гг. большинство исследований митохондрий сводилось к изучению механизмов синтеза АТФ. Вероятно, 1961 г. следует считать переломным моментом в истории биоэнергетики благодаря появлению хемиосмотической гипотезы П. Митчелла, предложенной им вместо так называемой «химической теории» консервации энергии. В течение последовавших за этим пяти лет появлялись новые данные в пользу того, что консервация энергии в митохондриях происходит в результате электрохимической активности протонов (protonmotive force). Эта активность представляет собой их перемещение из матрикса через внутреннюю мембрану в межмембранное пространство с помощью протонного насоса, зависящего от переноса электронов по дыхательной цепи в процессе окисления. Сегодня хемиос-

мотическая теория, вероятно, лучше других объясняет как нормальное протекание процесса консервации энергии, так и его нарушения. Современные представления о пространственном взаиморасположении комплексов дыхательной цепи митохондрий и об их ферментативной активности схематически представлены на рис. 30.

Идея о самостоятельном воспроизводстве митохондрий внутри клетки всегда была популярна среди исследователей, хотя бы потому, что до начала 1920-х гг. многие естествоиспытатели рассматривали митохондрии как эндосимбиотические микроорганизмы. Постепенно накапливались сведения о способности этих органелл синтезировать белок, причем в условиях, отличавшихся от биосинтеза в цитоплазме. Обнаружение мтДНК, с одной стороны, подтвердило мнение об относительной самостоятельности митохондрий, а с другой — показало, насколько она относительна, столь небольших размеров оказалась ДНК митохондрий, имеющая вид двухнитевого кольца.

Действительно, определение полной нуклеотидной последовательности мтДНК человека из 16 569 нуклеотидных пар показало, что она содержит всего 37 генов. Семь из вышеупомянутых 13 полипептидов, кодируемых мтДНК, входят в состав комплекса I (NADH-дегидрогеназы — коэнзим Q оксидоредуктазы), один представляет собой субъединицу комплекса III (коэнзим Q — цитохром *c* оксидоредуктазы), три — субъединицы комплекса IV (цитохром *c* оксидазы) и два являются субъединицами комплекса V (АТФ-синтетазы). Каждый из ферментных комплексов содержит и субъединицы, кодируемые в ядре. Сукцинатдегидрогеназа, образующая комплекс II, вообще не имеет субъединиц, кодируемых в митохондриях.

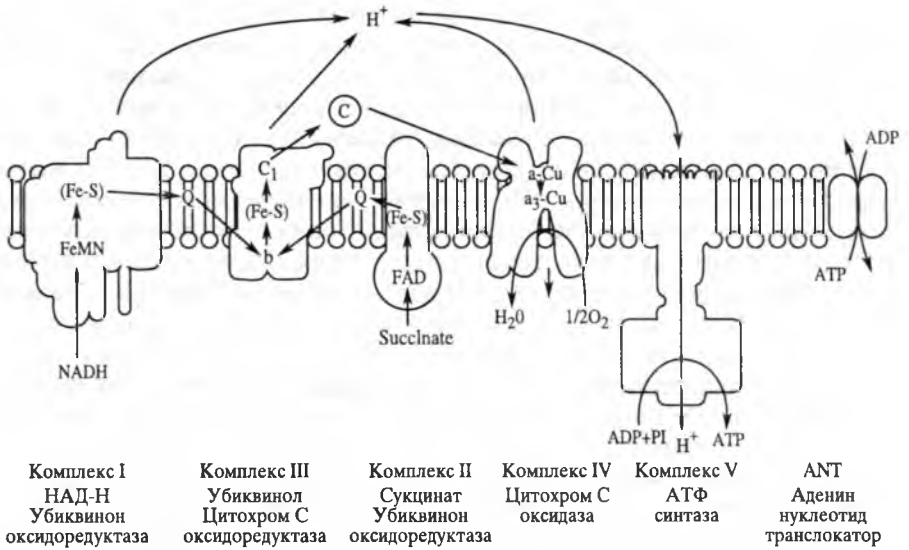
Остальные 24 гена мтДНК необходимы для трансляции белка на митохондриальных рибосомах (генетический код митохондрий несколько отличается от ядерного, поэтому синтез белка в них требует присутствия собственного вспомогательного аппарата). Из этих генов — 22 кодируют тРНК, а два — рибосомальные РНК митохондрий. Схема строения мтДНК представлена на рис. 31.

Симптомы многих тяжелых заболеваний, о которых речь пойдет ниже, связаны с рядом мутаций в мтДНК, вызывающих расстройства тканевого дыхания, как правило, из-за нарушения структуры и функций того или иного ферментного комплекса.

## «Митохондриальная медицина» и особенности генетики митохондрий

Независимо от того, корректен термин «митохондриальная медицина» или нет, болезни, прямо связанные с расстройствами биохимических процессов в митохондриях, существуют и даже выделяются в особую группу заболеваний, передаваемых по принципу «материнского наследования».

Открытие митохондриальной патологии произошло буквально у постели больного, точнее, больной. В 1959 г. Рольф Люфт впервые наблюдал пациентку с симптомами явного истощения на фоне потребления чрезмерных количеств пищи (свыше 3000 ккал в день) при стабильном весе в 38 кг, чрезвычайно обильного потоотделения даже в прохладном помещении и выраженной мышечной слабости. Проведя вместе с Ларсом Эрнстером и другими сотрудниками измерения основного обмена пациентки, а также потребления кислорода и эффективности фосфорилирования в изолированных волокнах мышцы, Люфт пришел к выводу о «недостаточном сопряжении» окисления и фосфорилирования как о причине, вызвавшей избыточную теплопродукцию, которую организм пытался компенсировать.



Субъединицы

мтДНК	7	1	0	3	2	0
ядДНК	-32	-9	4	10	10	1
Всего	-39	-10	4	13	12	1

Рис. 30. Взаиморасположение комплексов дыхательной цепи митохондрий и их ферментативная активность

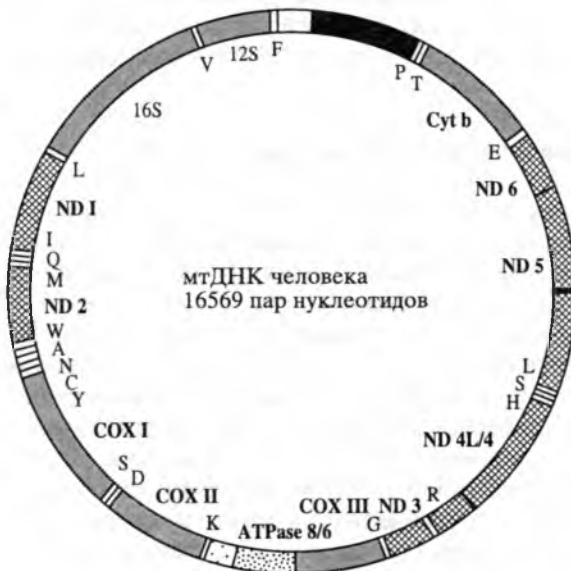


Рис. 31. Схема строения мтДНК: обозначены гены, кодирующие субъединицы комплексов I (ND 1-6), III (Cytb), IV (COX I-III) и V (АТPase 8 и 6), а также 2-х рРНК (12S и 16S) и 22-х тРНК (использован однобуквенный код соответствующих аминокислот)

ровать обильным потоотделением, и интенсивное, но неэффективное окисление субстратов в цепи тканевого дыхания, вызывавшее огромное и почти напрасное потребление пищи. Дальнейшие исследования этого и другого клинического случая «болезни Люффа» подтвердили правильность сделанного вывода — окисление и фосфорилирование в митохондриях пациентов были разобщены, а соотношения ферментных комплексов в дыхательной цепи нарушено [Luft, 1994].

Данные клинических и лабораторных исследований, накопленные с тех пор, позволили, с одной стороны, описать почти 200 синдромов митохондриальной патологии, с другой стороны, прийти к общей концепции заболеваний, вызванных нарушением окислительного фосфорилирования (ОХРНOS). Следует заметить, что нарушения энергетического обмена в митохондриях служат причиной не только некоторых наследственных болезней, но и длинного перечня дегенеративных заболеваний, симптомами которых вызваны энергетической недостаточностью в органах и тканях, «критически» зависящих от пополнения запасов АТФ, — головном мозге, миокарде и скелетной мускулатуре, сетчатке глаза, островках Лангерганса и др. Дегенеративные изменения, отмечаемые на фоне снижения продукции энергии митохондриями и сходные с наблюдаемыми при сахарном диабете [Gerbitz, 1992], болезни Паркинсона [Mizuno et al., 1995], кардиомиопатиях [Hattori et al., 1991], болезни Альцгеймера [Ebner et al., 1998] и других заболеваниях, обнаруживаются в тканях соответствующих органов у клинически здоровых пожилых людей. Поэтому общая концепция митохондриальной патологии как первоосновы старения и дегенеративных заболеваний базируется на четырех постулатах: 1) ОХРНOS генерирует митохондриальную энергию, запасаемую в виде АТФ; 2) ОХРНOS — основной источник АТФ для различных тканей и органов, в том числе — для мозга, поперечно-полосатой мускулатуры, почек, сетчатки, панкреатических островков; 3) генетика ОХРНOS обусловлена наличием мутаций как в ядерной, так и мтДНК; 4) с возрастом уровень ОХРНOS в тканях снижается [Wallace, 1992a].

Оставив на время в стороне вопрос о старении и дегенеративных заболеваниях без явно выраженной тенденции к наследованию, рассмотрим более пристально болезни ОХРНOS, передаваемые по материнской линии.

Поскольку речь идет о генетических закономерностях возникновения митохондриальной патологии, следует перечислить особенности генетики митондрий, отличающие ее от хорошо известных принципов наследования признаков, кодируемых ядерной ДНК. Таких особенностей пять [Wallace, 1992b].

Во-первых, мтДНК полуавтономна, что неудивительно, если вспомнить об эндосимбиотическом происхождении митондрий. Эта автономия подтверждается, в частности, возможностью переноса как митондрий, так и мтДНК между культивируемыми клетками человека. Целенаправленно измененные образцы мтДНК, инъецированные в клетку с интактной мтДНК, реплицировались в этой клетке и переходили из митондрии в митондрию в процессе слияния и разделения оргanelл.

Во-вторых, млекопитающие получают мтДНК, в основном, от матери. Это объясняется тем, что число копий мтДНК в яйцеклетке достигает нескольких сотен тысяч, тогда как в сперматозоиде их содержится на три порядка меньше [Gyllensten et al., 1991]. То малое количество мтДНК, которое привносится в зиготу мужской половой клеткой, оказывает слишком незначительное влияние на ее митохондриальный генотип.

Третьей отличительной чертой митохондриальной генетики является то, что мтДНК подвергается репликативному отбору как при митозе, так и при мейозе [Shoffner, Wallace, 1990]. Каждая клетка несет в себе сотни митохондрий и тысячи копий мтДНК. Поэтому уже в пределах отдельно взятой клетки нередко обнаруживается смесь мутантных и нормальных (дикого типа) мтДНК (*гетероплазмия*), что имеет очень большое значение для возникновения и развития болезней ОХРНOS, о чем речь пойдет далее. В ходе митотического и мейотического цитокинеза клеток с гетероплазмией доля мутантных и нормальных копий мтДНК, попадающих в ту или иную дочернюю клетку, может весьма заметно варьировать. В результате ряда последовательных делений могут возникать клеточные популяции, в которых митохондриальный геном представлен почти исключительно мутантными или только нормальными копиями мтДНК (*гомоплазмия*). Естественно, тяжесть расстройства энергетического метаболизма в клетке прямо пропорциональна доле мутантных копий мтДНК в ее митохондриях и варьирует от 100%-ной активности до нулевого уровня ОХРНOS. Таким образом, гетероплазмия и репликативный отбор нередко приводят к тому, что клетки или особи с идентичным ядерным геномом (например, однояйцевые близнецы) могут иметь различные митохондриальные генотипы и, как результат, различаться фенотипически [Wallace, 1992b].

В-четвертых, для генетики мтДНК характерен феномен *пороговой экспрессии*. У пациентов с определенными мутациями мтДНК фенотип зависит от тяжести расстройства ОХРНOS в той или иной ткани (что, конечно, зависит от вида мутации и ее локализации, а также от доли мутантных копий мтДНК в клетках), а также от того, насколько велико в норме потребление этой тканью энергии, продуцируемой в митохондриях. Порог уровня ОХРНOS, при падении ниже которого неизбежно возникают дегенеративные изменения, сильно варьирует для разных тканей. Он наиболее высок в нервной ткани, поперечно-полосатых мышцах и миокарде, сетчатке глаза, панкреатических островках Лангерганса и некоторых других тканях [Wallace, 1992b].

Пятой особенностью митохондриальной генетики является в 10–20 раз более высокий уровень эволюционной изменчивости мтДНК по сравнению с ДНК ядра. Это означает, что вредные мутации в ДНК митохондрий возникают гораздо чаще, чем в ядерном геноме. Несмотря на то, что лишь около 20% компонентов ОХРНOS кодируются в митохондриях, а остальные – в ядре, гораздо чаще возникают расстройства тканевого дыхания, вызванные мутациями мтДНК.

Из этого следует, что как сравнительно безвредные, так и вредные мутации мтДНК в значительных количествах закрепляются в человеческой популяции.

## Причины возникновения и характерные симптомы болезней ОХРНOS

Сравнительно частое возникновение и закрепление мутаций мтДНК в геноме человека, как уже говорилось, проявляется в виде примерно 200 патологических синдромов. Из этого огромного числа выделим несколько с наиболее четкими клиническими характеристиками:

- синдром Кирнс–Сэйра (Kearns–Sayre syndrome, KSS) с офтальмоплегией, дегенерацией сетчатки, атаксией, гиперпаратиреоидизмом;

- хроническая прогрессирующая наружная офтальмоплегия (chronic progressive external ophthalmoplegia, CPEO) с симптомами, сходными с таковыми при KSS, но также с параличом наружных мышц глазного яблока, блефароптозом и центральными нервными расстройствами;
- синдром Пирсона (Pearson's syndrome) или панцитопения раннего детского возраста с атрофией селезенки и фиброзом поджелудочной железы;
- синдром миоклональной эпилепсии с рваными красными волокнами (myoclonus epilepsy with ragged red fibers, MERRF), с явлениями тяжелого миоклонуса, эпилепсии, прогрессирующей атаксии, мышечной слабости, нарастающей глухоты и деменции;
- синдром митохондриальной миопатии, энцефалопатии, молочнокислого ацидоза и инсультоподобных эпизодов (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, stroke-like episodes – MELAS), характеризующийся выраженной миопатией с рваными красными мышечными волокнами, генерализованными судорогами, резко повышенным содержанием в крови молочной кислоты, глухотой, иногда – корковой слепотой, приступами рвоты;
- наследственная оптическая нейроретинопатия Лебера (Leber's hereditary optic neuroretinopathy, LHON), характеризующаяся быстрой потерей зрения, двигательными расстройствами, изменениями сердечной проводимости и сократимости, микроангиопатией сетчатки;
- болезнь Лея (Leigh disease) или подострая некротизирующая энцефаломиопатия с нарушениями дыхания, пониженной остротой зрения и слуха, мышечной слабостью, атаксией, гипотензией, недостаточным весом тела;
- синдром Альпера (Alper syndrome) или прогрессирующая детская полиидиофрения, для которой характерны судороги, спазмы, слепота, деменция и дисфункции печени, сопровождаемые специфической дегенерацией головного мозга.

Клинические проявления перечисленных заболеваний могут видоизменяться, причем нередко случаи «обмена» симптомами между различными синдромами, что сильно затрудняет диагноз. До момента открытия первых мутаций мтДНК, вызывающих возникновение вышеперечисленных синдромов, причины такого обмена были непонятны, однако за последние годы охарактеризованы нарушения структуры мтДНК у сотен пациентов, что позволяет даже систематизировать нозологические формы в зависимости от молекулярного механизма, лежащего в основе расстройства OXPHOS.

Каждый из известных сегодня синдромов, вызванных нарушением OXPHOS, определяется какой-либо мутацией следующего типа [Wallace, 1992a]:

- нуклеотидные замены в генах, кодирующих полипептидные цепи (missense-мутации);
- нуклеотидные замены в генах, кодирующих тРНК;
- делеции или вставки в мтДНК;
- мутации, изменяющие число копий мтДНК.

Для иллюстрации того, как влияют изменения в митохондриальном гено типе на появление тех или иных симптомов, рассмотрим несколько примеров наиболее подробно описанных заболеваний. В этом нам поможет схема мутаций мтДНК, представленная на рис. 32.



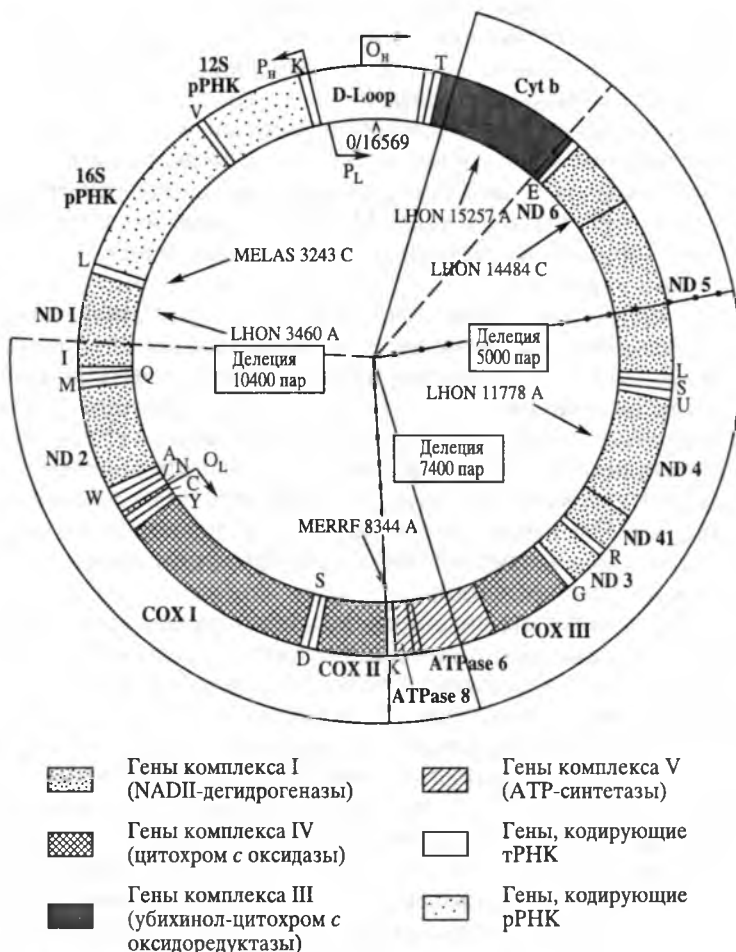


Рис. 32. Схема мутаций мтДНК

### **LHON – пример синдромов, вызванных нуклеотидными заменами в генах мтДНК, кодирующих белковые цепи**

Наследуемая по материнской линии болезнь начинается в молодом возрасте с быстро нарастающей слепоты, вызванной двусторонней атрофией зрительного нерва. Попутно обнаруживаются тремор, дистония, изменения на ЭКГ, характерные для нарушений сердечной проводимости, иногда отчетливые изменения структуры putamen, выявляемые при ЯМР-исследовании головного мозга [Larsson et al., 1991]. Позднее присоединяются нарастающие по тяжести неврологические и психические расстройства и выраженная мышечная слабость.

При LHON описано не менее четырех различных мутаций мтДНК (см. рис. 32), наиболее частой из которых является замена G → A в 11778-й позиции.

Этот нуклеотид входит в ген, кодирующий четвертую субъединицу НАДН-дегидрогеназы (*ND4*), и при трансляции мутантной мтДНК аргинин в 340-й позиции полипептидной цепи заменяется на гистидин.

Во многих случаях LHON болезнь развивалась у пациентов с гетероплазмией, имеющей тенденцию к гомоплазмии по мутантной мтДНК (с заменой G → A в положении 11778). При других missense-мутациях (см. рис. 32), также приводящих к замене высоко- или умеренноконсервативных аминокислот, отмечался аналогичный феномен [Wallac, 1992b]. Таким образом, три критерия позволяют считать эти мутации непосредственно связанными с возникновением LHON:

- 1) гетероплазмия с нарастанием доли мутантной мтДНК;
- 2) существенно более высокая доля мутантной мтДНК у пациентов, чем в митохондриях здоровых индивидуумов;
- 3) замена эволюционно консервативной аминокислоты (постоянство ее присутствия в нормальном белке, т.е. «консервативность», свидетельствует о биохимической значимости).

Изучение родословных, в которых обнаруживались пациенты с LHON, показало, что четыре часто встречаемых точковых мутации мтДНК могут последовательно накапливаться в поколениях одной семьи [Wallac, 1992b]. Вероятность возникновения LHON существенно возрастает с приобретением каждой новой мутации. Поскольку мутации затрагивают различные компоненты дыхательной цепи (разные субъединицы НАДН-дегидрогеназы или цитохром *b* – компонент комплекса III), исследователи склонны считать, что молекулярный механизм LHON состоит не в выпадении функции отдельного фермента, а скорее, в снижении эффективности переноса электронов в митохондриальной цепи в целом [Brown et al., 1992].

### **MERRF и MELAS – примеры заболеваний OXPHOS, вызванных нуклеотидными заменами в генах, кодирующих тРНК**

MERRF возникает, когда порогового уровня (для каждой ткани – своего) достигает гетероплазмия по мтДНК с мутацией в гене, кодирующем тРНК<sup>Лиз</sup> (8344-й нуклеотид, см. рис. 32). Болезнь наследуется по материнской линии, в тяжелых случаях у пациентов отмечаются миоклоническая эпилепсия (неконтролируемые подергивания тела), энцефаломиопатия, судороги, мозжечковая атаксия, нейросенсорные слуховые расстройства, дилатационная кардиомиопатия, почечная недостаточность, респираторные нарушения, слабоумие. Все эти тяжелые расстройства являются проявлением недостаточности дыхательных комплексов I и IV, вызванной, в свою очередь, нарушенным биосинтезом их компонентов [Schoffner et al., 1991]. С возрастом состояние пациентов ухудшается, причем у родственников по материнской линии, больных MERRF, постепенно сглаживаются специфические особенности, обусловленные поражением определенной ткани (органа), но нарастает общая тяжесть заболевания [Wallac, 1992a]. При окрашивании срезов из биоптатов мышечной ткани красителем Гомори трехцветным у пациентов обнаруживаются «рвано-красные» волокна, что вызвано присутствием большого числа митохондрий. Специфична и гистохимическая картина, наблюдаемая при параллельном окрашивании срезов на активность сукцинатдегидрогеназы и цитохромоксидазы. Активность первого из ферментов в рвано-красных волокнах повышена, второго – практически сведена к нулю.

**MELAS** вызывается гетероплазмией по мутации в 3243-м нуклеотиде (см. рис. 32), входящем в состав гена *mPHK<sup>Лсн</sup>*. Пациенты страдают от периодически возникающих инсультоподобных состояний, оставляющих в коре и белом веществе головного мозга следы, выявляемые с помощью ЯМР или компьютерной томографии. Нередко к этому присоединяются симптомы корковой слепоты, молочно-кислого ацидоза, неврологические расстройства и с возрастом общая тяжесть заболевания возрастает. Хотя некоторые проявления MELAS совпадают с MERRF (рванокрасные волокна, судороги, деменция, энцефаломиопатия), в целом, клиническая картина характерна для каждого из заболеваний. Это лишний раз подчеркивает, что взаимоотношения между фенотипом и митохондриальным генотипом изучены недостаточно хорошо, поскольку логично было бы предположить, что любые нарушения биосинтеза белка (вызванные в двух рассмотренных случаях мутациями генов различных тРНК) приведут к сходным клиническим проявлениям.

### **СРЕО, синдром Пирсона и KSS – болезни, вызванные делециями мтДНК**

Эти заболевания не всегда имеют семейную историю, так как обследование родственников пациента в некоторых случаях указывало на возникновение мутации *de novo* [Shoffner, Wallace, 1990]. Описан случай, когда гигантская делеция мтДНК не была унаследована дочерью пациентки с KSS [Larsson et al., 1992]. Это свидетельствовало о возможности клонального размножения делетированной копии мтДНК, возникшей в оогенезе или раннем эмбриогенезе.

Делеции, обнаруживаемые при СРЕО, KSS и синдроме Пирсона, как правило, огромны (см. рис. 32). В 30–50% случаев KSS встречается делеция протяженностью почти в 5000 нуклеотидов (5 т.п.н.). Второе и третье по частоте места занимают, соответственно, делеции величиной в 7,4 т.п.н. и 10,4 т.п.н. Вскоре после обнаружения столь обширных дефектов в мтДНК пациентов с миопатиями было найдено, казалось бы, предельно логичное объяснение одного из важнейших феноменов митохондриальной патологии – *репликативного преимущества* мутантных копий мтДНК, позволяющего им воспроизводиться быстрее, чем полноразмерным молекулам. Действительно, укороченная на 30–65% мтДНК, очевидно, должна затратить на свое удвоение гораздо меньше времени, чем интактная. Однако более поздние исследования показали, что репликативным преимуществом пользуются и копии мтДНК с точковыми мутациями [Yoneda et al., 1992]. По-видимому, одной лишь разницей в длине реплицируемой последовательности этот феномен объяснить нельзя.

По существу все три заболевания (СРЕО, KSS и синдром Пирсона) являются разными фенотипическими проявлениями одного и того же генетического дефекта – гигантской делеции мтДНК. Нередко болезнь начинается с симптомов СРЕО, но с возрастом прогрессирует (параллельно с увеличением доли мутантной мтДНК в миоцитах), приводя пациентов к гибели от KSS. Синдром Пирсона – это, как правило, фатальное заболевание раннего детского возраста, проявляющееся прежде всего в тяжелой панцитопении. Известны случаи излечения детей от заболевания, благодаря систематическим переливаниям крови. Однако выздоровление от одного фенотипического проявления делеции мтДНК приводило к появлению другого, еще более тяжелого – KSS, от которого пациенты погибали. Эти тяжелые клиниче-

ские случаи являются отражением феномена «переключения» экспрессии мутаций с одной ткани (костный мозг) на другую (миоциты).

**Болезни, вызванные изменением числа копий мтДНК**, в основном, проявляются как летальные митохондриальные миопатии и/или тяжелая печеночная либо почечная недостаточность [Wallac, 1992 b]. При исследовании *post mortem* тканей пациентов с подобными синдромами были обнаружены резко сниженные уровни мтДНК (2–17% от нормы). Обычно гибель наступает уже в раннем детском возрасте.

## Моделирование болезней OXPHOS на лабораторных животных

Определение делеций или точковых мутаций мтДНК, приводящих к заболеваниям, позволило применять молекулярные зонды для точной диагностики болезней OXPHOS. Однако многие вопросы, связанные с развитием этих заболеваний, остались без ответа. По-прежнему непонятно, почему мутантные мтДНК реплицируются быстрее, чем нормальные. Совершенно неясно, почему при некоторых точковых мутациях относительное содержание в клетках мутантной мтДНК на протяжении нескольких поколений сохраняется неизменным и специфичным для каждой из отдельно взятых семей в родословной. Не найдено удовлетворительного ответа и на коренной вопрос о механизмах, вызывающих более частое (в 10 раз), чем в ядерной ДНК, возникновение мутаций мтДНК как в яйцеклетках, так и на ранних стадиях развития организма. Без выяснения этих вопросов развитие исследований в области молекулярной генетики митохондриальных болезней неизбежно замедлится.

Адекватным подходом для ответа на все или большую часть неясных на сегодня вопросов могло бы явиться моделирование болезней OXPHOS на животных. До недавнего времени все попытки смоделировать митохондриальную патологию были ориентированы на угнетение функций митохондрий с помощью химических препаратов и получение отдельных симптомов, сходных с наблюдаемыми при болезнях OXPHOS. Но подобные вмешательства совершенно исключали возможность поиска адекватной терапевтической коррекции заболевания, не говоря о том, что ничего общего с наследственной патологией они не имеют.

В последние годы опубликованы результаты нескольких работ, направленных на генно-инженерное моделирование митохондриальных болезней, конкретно — на создание трансгенных животных с истинной митохондриальной гетероплазмией.

Перспективным принципиальным подходом к такому моделированию считается исследование животных, полученных из оплодотворенных яйцеклеток, в которые были введены митохондрии с чужеродной или целенаправленно измененной ДНК [Jenuth et al., 1997; Irwin et al., 1999; Levy et al., 1999; Marchington et al., 1999]. Зиготы имплантируются в организм самки и, в случае успеха, проходят весь путь внутриутробного развития.

Предварительные исследования на клеточных культурах указывают на отсутствие биологических барьеров, которые препятствовали бы слиянию митохондрий и объединению их генетического материала в пределах одной клетки. Не обнаружено и выраженной видовой специфичности митохондрий.

Большая часть экспериментов, проводимых сегодня в различных лабораториях, осуществляется с использованием митохондрий из одной линии мышей для введения в зиготу другой мышшиной линии [Jenuth et al., 1997; Irwin et al., 1999]. Однако недавно была показана [Rinaudo et al., 1999; Vasilyev et al., 1999] возмож-

ность введения мтДНК человека в зиготу мыши с сохранением чужеродной мтДНК в зародыше, культивировавшемся *in vitro* в течение всего доимплантационного периода, т.е. до стадии бластоцисты. В последующих экспериментах были получены трансмитохондриальные мыши, развившиеся из зигот, в которые была введена мтДНК человека. Животные в некоторых органах имели мтДНК человека, где она обнаруживалась наряду с мтДНК мыши [Vasilyev et al., 2001]. Насколько пригодным окажется этот экспериментальный подход для моделирования наследственной патологии у животных, сходной с заболеваниями человека при мутациях в мтДНК, покажет близкое будущее. Пока же имеются любопытные результаты по введению мышинной мтДНК с искусственно полученной обширной делецией в мышиную же зиготу [Inoue et al., 2000]. У развившихся из зародышей мышей авторы ожидали получить симптомы поражения скелетной мускулатуры, миокарда, нервной ткани, т.е. типичные признаки человеческих заболеваний, например, KSS. Однако животные таких признаков не имели, но по истечении примерно 200 дней со дня появления на свет они погибали, как показали биохимические и морфологические исследования от тяжелой почечной недостаточности. Этот результат явился тем более неожиданным, что у людей с мутациями в мтДНК поражения почек встречаются редко и, как правило, носят вторичный характер.

Таким образом, эти результаты еще раз демонстрируют насколько неполны имеющиеся сведения о фенотипических проявлениях нарушений в структуре мтДНК.

## Литература

*Brown M.D., Voljavec A.S., Lott M.T. et al.* Mitochondrial DNA complex I and III mutations associated with Leber's hereditary optic neuropathy // *Genetics*. 1992. Vol. 130. P. 163–173.

*Ebneth A., Godeman R., Stamer A. et al.* Overexpression of tau protein inhibits trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer's disease // *J. Cell Biol.* 1998. Vol. 143. P. 777–794.

*Gerbitz K.-D.* Does the mitochondrial DNA play a role in the pathogenesis of diabetes? // *Diabetologia*. 1992. Vol. 35. P. 1181–1186.

*Gyllenstein U., Wharton D., Josefsson A., Wilson A.C.* Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice // *Nature*. 1991. Vol. 352. P. 255–257.

*Hattori K., Ogawa T., Kondo T. et al.* Cardiomyopathy with mitochondrial DNA mutations // *Heart J.* 1991. Vol. 122. P. 866–869.

*Inoue K., Nakada K., Ogura A. et al.* Generation of mice with mitochondrial dysfunction by introducing mouse mtDNA carrying a deletion into zygotes // *Nature Genet.* 2000. Vol. 26. P. 176–181.

*Irwin M.H., Johnson L.W., Pinkert C.A.* Isolation and microinjection of somatic-cell derived mitochondria and germline heteroplasmy in transmitochondrial mice // *Transgenic Res.* 1999. Vol. 8. P. 119–123.

*Jenuth J.P., Peterson A.C., Shoubridge E.A.* Tissue-specific selection for different mtDNA genotypes in heteroplasmic mice // *Nature Genet.* 1997. Vol. 16. P. 93–95.

*Larsson N.-G., Andersen O., Holme E. et al.* Leber's hereditary optic neuropathy and complex I deficiency in muscle // *Annals Neurol.* 1991. Vol. 30. P. 701–708.

*Larsson N.-G., Eiken H.G., Boman H.* et al. Lack of transmission of deleted mtDNA from a woman with Kearns-Sayre syndrome to her child // *Am. J. Hum. Genet.* 1992. Vol. 50. P. 360–363.

*Levy S.E., Waymire K.G., Kim Y.L.* et al. Transfer of chloramphenicol-resistant mitochondrial DNA into the chimeric mouse // *Transgenic Res.* 1999. Vol. 8. P. 137–145.

*Luft R.* The development of mitochondrial medicine // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994. Vol. 91. P. 8731–8738.

*Marchington D.R., Barlow D., Poulton J.* Transmitochondrial mice carrying resistance to chloramphenicol on mitochondrial DNA: Developing the first mouse model of mitochondrial DNA disease // *Nature Med.* 1999. Vol. 5. P. 957–960.

*Mizuno Y., Ikebe S., Hattori N.* et al. Role of mitochondria in the etiology and pathogenesis of Parkinson's disease // *Biochim. Biophys. Acta.* 1995. Vol. 1271. P. 265–274.

*Rinaudo P., Niven-Fairchild T., Buradagunta S.* et al. Microinjection of mitochondria into zygotes creates a model for studying the inheritance of mitochondrial DNA during preimplantation development // *Fertil. Steril.* 1999. Vol. 71. P. 912–917.

*Schatz G.* Mitochondria. The next 100 years // *Karger Gazette.* 1994. Vol. 58. P. 1–2.

*Schoffner J.M., Lott M.T., Wallace D.C.* MERRE: a model disease for understanding the principles of mitochondrial genetics // *Rev. Neurol.* 1991. Vol. 147. P. 431–435.

*Schoffner J.M., Wallace D.C.* Oxidative phosphorylation diseases: disorders of two genomes // *Adv. Hum. Genet.* 1990. Vol. 19. P. 267–330.

*Vasilyev V.B., Sokolova V.A., Arbusova N.I.* et al. Human mtDNA persists in some organs of mouse embryos and of neonate mice originated from zygotes microinjected with human mitochondria // *Mitochondrion.* 2001. Vol. 1. Suppl. 1. P. S94–S95.

*Vasilyev V.B., Sokolova V.A., Sorokin A.V.* et al. Persistence of human mitochondrial DNA throughout the development to the blastocyst of mouse zygotes microinjected with human mitochondria // *Zygote.* 1999. Vol. 7. P. 279–283.

*Wallace D.C.* Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases? // *Science.* 1992a. Vol. 256. P. 628–632.

*Wallace D.C.* Diseases of the mitochondrial DNA // *Ann. Rev. Biochem.* 1992b. Vol. 61. P. 1175–1212.

*Yoneda M., Chomyn A., Martinuzzi A.* et al. Marked replication advantage of human mtDNA carrying a point mutation that causes the MELAS encephalomyopathy // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992. Vol. 89. P. 11164–11168.

# Молекулярные механизмы этиопатогенеза болезней экспансии повторяющихся последовательностей

В.В. Стрельников, Д.В. Залетаев

Экспансия повторяющихся последовательностей — новый класс патогенных мутаций у человека, описанный относительно недавно. Впервые экспансия микросателлитного (тринуклеотидного) повтора, приводящая к экспрессии патологического фенотипа, была показана для одного из наиболее распространенных наследственных заболеваний — синдрома Мартина—Белл в 1991 г. За прошедшие 13 лет список болезней экспансии пополнился 15 формами, связанными с экспансией тринуклеотидных повторов, и, по крайней мере, тремя — сопровождающимися экспансией более протяженных элементов (табл. 16).

Болезни экспансии объединены несколькими общими свойствами. Во-первых, мутантные повторы проявляют как мейотическую, так и митотическую нестабильность, причем в большинстве случаев наблюдается увеличение, а не сокращение числа повторяющихся единиц в ряду поколений. Во-вторых, отмечена корреляция между длиной повторов и возрастом начала заболевания, а также выраженностью клинической картины. Такое явление получило название *антиципации*. В-третьих, риск экспансии в большинстве случаев зависит от родительского происхождения аллеля.

Молекулярные механизмы этиопатогенеза болезней экспансии зависят от состава и числа нуклеотидов, образующих повторяющиеся единицы и расположения повторов относительно кодирующих участков генома. В связи с этим выделяют болезни *экспансии кодирующих и некодирующих повторов*. Первую группу составляют исключительно болезни экспансии тринуклеотидных повторов, поскольку составляющие их единицы представляют собой полноценные кодоны и изменение их числа не приводит к сдвигу рамки считывания.

## 4.1. БОЛЕЗНИ ЭКСПАНСИИ НЕКОДИРУЮЩИХ ПОВТОРОВ

Болезни экспансии некодирующих повторов обусловлены значительным увеличением длины повторяющихся последовательностей и сопровождаются множественной дисфункцией или дегенерацией различных тканей. Клинические проявления каждого заболевания варьиабельны, возможно, вследствие выраженной соматической гетерогенности мутаций. Аллели некодирующих повторов с выраженной экспансией обычно происходят из небольшого пула аллелей промежуточного размера. Степень экспансии, сопровождающаяся клиническими проявлениями заболевания, называется *полной мутацией*, а промежуточные размеры повторов обозначают термином «*премутация*».

## Болезни экспансии повторяющихся последовательностей

Нозологическая форма	Ген	Локус	Белок	Тип повтора	Размер повтора	
					норма	патология
<b>Болезни экспансии некодирующих повторов</b>						
Синдром Мартина—Белл	<i>FMR1</i>	Xq27.3	FMRP	CGG	6–53	>230
УО FRAXE	<i>FMR2</i>	Xq28	FMR2	GCC	6–35	>200
Атаксия Фридрейха	<i>X25</i>	Xq13-21.1	Фратаксин	GAA	7–34	>100
Миотоническая дистрофия, тип 1	<i>DMPK</i>	19q13.3	DMPK	CTG	5–37	>50
Спиноцеребеллярная атаксия, тип 8	<i>SCA8</i>	13q21	—	CTG	16–37	110–250
Спиноцеребеллярная атаксия, тип 12	<i>SCA12</i>	5q31-33	PP2A-PR55b	CAG	7–28	66–78
Спиноцеребеллярная атаксия, тип 10	<i>SCA10</i>	22q13	SCA10	ATTCT	10-22	≤4500
Миотоническая дистрофия, тип 2	<i>ZNF9</i>	3q21	ZNF9	CCTG	≤26	75–11000
Прогрессирующая миоклонус-эпилепсия	<i>CSTB</i>		CSTB	(C) <sup>4</sup> G(C) <sub>4</sub> GCG	2–17	30–75
<b>Болезни экспансии кодирующих повторов</b>						
Спинобульбарная мышечная атрофия (болезнь Кеннеди)	<i>AR</i>	Xq13-21	Андрогеновый рецептор	CAG	9–36	38–62
Хорея Гентингтона	<i>HD</i>	4p16.3	Гентингтин	CAG	6–35	36–121
Дентато-рубро-паллидо-люйисова атрофия	<i>DRPLA</i>	12p13.31	Атрофин-1	CAG	6–35	49–88
Спиноцеребеллярная атаксия, тип 1	<i>SCA1</i>	6p23	Атаксин-1	CAG	6–44	39–82
Спиноцеребеллярная атаксия, тип 2	<i>SCA2</i>	12q24.1	Атаксин-2	CAG	15–31	36–63
Спиноцеребеллярная атаксия, тип 3	<i>SCA3</i>	14q32.1	Атаксин-3	CAG	12-40	55-84
Спиноцеребеллярная атаксия, тип 6	<i>CACNL1A4</i>	19p13	CACNA1A	CAG	4–18	21–33
Спиноцеребеллярная атаксия, тип 7	<i>SCA7</i>	13p12-13	Атаксин-7	CAG	4–35	37–306
Спиноцеребеллярная атаксия, тип 17	<i>TBP</i>	6q27	TBP	CAG	29–42	47–55
Окулофарингеальная мышечная дистрофия	<i>PABP2</i>	14q11	PABP2	GCG	6	7–13



Несмотря на ряд общих свойств, некодирующие повторы, нестабильность которых приводит к болезням экспансии, различаются как нуклеотидным составом повторяющихся единиц, так и расположением относительно кодирующих и регуляторных элементов генов, что обуславливает уникальность механизмов патогенеза каждого заболевания. Ниже будут рассмотрены механизмы патогенеза каждой болезни экспансии некодирующих повторов в отдельности.

## Синдром Мартина–Белл (СМБ) (синдром ломкой X-хромосомы, FRAXA)

СМБ — наиболее распространенная наследственная форма умственной отсталости с частотой 1:4000 мужчин и 1:8000 женщин. Клиническая картина заболевания может включать в себя макроорхизм, некоторые признаки черепно-лицевого дисморфизма, повышенную эластичность соединительной ткани. У подавляющего большинства больных с СМБ причиной заболевания является экспансия полиморфного повтора CGG, расположенного в 5'-нетранслируемой области гена *FMR1* (fragile X mental retardation gene). У нормальных индивидуумов длина этого повтора варьирует от 2 до 54 триплетов. Увеличение длины повтора в пределах от 52 до 200 триплетов (премутация) не сопровождается экспрессией патологического фенотипа. Дальнейшая экспансия (свыше 200 копий) сопровождается клиническими проявлениями СМБ и представляет собой полную мутацию. Культивирование лимфоцитов больных с полной мутацией на фолатдефицитной среде приводит к экспрессии на X-хромосоме в области расположения тринуклеотидного повтора фолатчувствительного ломкого участка *FRAXA*, которому синдром обязан одним из своих названий. Полные мутации ассоциированы с аномальным метилированием промоторной области гена *FMR1*. Гиперметилирование промотора приводит к подавлению транскрипции *FMR1*, что выражается в отсутствии соответствующей мРНК и белкового продукта FMRP (fragile X mental retardation protein).

FMRP представляет собой РНК-связывающий белок, циркулирующий в клетке между ядром и цитоплазмой. В цитоплазме FMRP формирует матричные рибонуклеопротеиновые комплексы, связывающиеся с рибосомами. Наибольшая экспрессия *FMR1* отмечена в тканях мозга. Возможно, в нейронах FMRP определяет внутриклеточное расположение и регулирует трансляцию определенных мРНК-мишеней. Не исключено, что причиной умственной отсталости при СМБ может быть нарушение синтеза белков в ходе установления и функционирования синаптических контактов.

## Умственная отсталость, ассоциированная с ломким участком FRAXE (УО FRAXE)

УО FRAXE относится к несиндромальным формам X-сцепленной умственной отсталости. В отличие от СМБ, при УО FRAXE не отмечено признаков дисморфогенеза. Основное клиническое проявление заболевания — задержка интеллектуального развития; выраженное отставание в освоении речи, чтения и письма. У больных проявляются также некоторые неспецифические поведенческие особенности: рассеянное внимание, гиперактивность, иногда — аутизм.

УО FRAXE — редкое наследственное заболевание. Его популяционная частота составляет приблизительно 1:50000. За период с 1992 г., когда были описаны первые семьи с УО FRAXE, до настоящего времени, во всем мире выявлено всего лишь около трех десятков больных.

Заболевание вызывается экспансией полиморфного повтора GCC, расположенного в промоторной области гена *FMR2*. По аналогии с СМБ, при УО FRAXE экспансия повтора приводит к экспрессии фолатчувствительного ломкого участка (*FRAXE*), гиперметилированию промотора гена *FMR2* и подавлению его транскрипции с потерей белкового продукта (*FMR2*). *FMR2* не имеет никакой гомологии с геном *FMR1*, хотя, вероятно, и является геном домашнего хозяйства. Ген *FMR2* кодирует транскрипционный фактор, о чем свидетельствует высокий уровень гомологии с геном *AF-4* человека. *FMR2* экспрессируется в различных областях мозга человека, но наиболее высокий уровень экспрессии отмечен в гиппокампе, что вполне соответствует современным представлениям о клинике УО FRAXE.

### Атаксия Фридрейха (АФ)

АФ — заболевание с аутосомно-рецессивным типом наследования. Этим объясняется, что АФ — единственная болезнь экспансии, при которой не наблюдается антиципации. Клинические проявления заболевания включают атаксию, дизартрию, ослабление рефлексов, кардиомиопатию и диабет. При атаксии Фридрейха показана дегенерация нейронов спинного мозга, ганглиев дорсальных корешков и некоторых периферических сенсорных систем. Заболевание вызвано экспансией внутриинтронного повтора GAA в гене *X25* (ген фратаксина), приводящей к снижению экспрессии гена. Предполагается, что возникающая в результате экспансии протяженная повторяющаяся АТ-богатая последовательность образует необычные структуры, затрудняющие нормальную транскрипцию. Нарушение экспрессии фратаксина приводит к аномальному накоплению железа в митохондриях, утрате митохондриальной ДНК, нарушениям клеточного дыхания и работы железо-серо-зависимых ферментов, повышенной чувствительности к оксидативному стрессу.

### Миотоническая дистрофия, тип 1 (МД1)

МД1 — аутосомно-доминантное мультисистемное заболевание с варибельными клиническими проявлениями и выраженной антиципацией. У больных с МД1 наблюдаются многообразные и, на первый взгляд, абсолютно не связанные друг с другом симптомы — миотония, мышечная дистрофия, нарушения сердечной проводимости, катаракта, эндокринные расстройства. Врожденная форма заболевания может проявляться множественными пороками развития, гипотонией, респираторным дистрессом и умственной отсталостью. Анализ сцепления показал, что МД1 может вызываться мутациями в двух различных генетических локусах, *DM1* и *DM2*, расположенных соответственно в хромосомных сегментах 19q13 и 3q21. МД1 связана с экспансией повтора CTG, расположенного одновременно в 3'-нетранслируемой области гена протеинкиназы *DMPK* и в промоторной области гена *SIX5* на хромосоме 19 (19q13).

Патофизиология заболевания исключительно сложна и рассматривается как комплекс молекулярных дефектов, имеющих различные проявления в разных тканях организма в процессе его развития. Экспансия повтора СТГ может косвенно воздействовать на уровень DMPK внутри клетки, нарушая процессы транскрипции гена, процессинга РНК и/или трансляции. Известно, что мРНК, содержащая протяженный повтор CUG, накапливается внутри ядра, не попадая в цитоплазму, где должны происходить процессы трансляции. Естественным результатом изменения внутриклеточной концентрации DMPK должно стать аномальное фосфорилирование субстратов этого фермента.

Такое, вполне логичное, описание патогенеза МД1, к сожалению, не может объяснить всего многообразия клинических проявлений заболевания, что было наглядно продемонстрировано на мышцах с дефектом гена *dmpk*.

После идентификации двух генов, фланкирующих *DMPK*, возникла новая гипотеза, объясняющая разнообразие эффектов экспансии тринуклеотидного повтора при МД1. Согласно этой гипотезе, экспансия повтора СТГ может влиять на структуру хроматина *in cis*, изменяя при этом экспрессию близлежащих генов: *DMANP*, в пределах промоторной области которого расположен повтор СТГ, и *DMWD*, расположенного проксимальнее *DMPK* и в непосредственной близости от него. Изменение функций белковых продуктов этих генов могло бы стать причиной некоторых фенотипических проявлений МД1.

Еще один механизм патогенеза МД1 может быть основан на приобретении транскриптом, содержащим протяженный тракт CUG, новой функции. Речь идет о *транс*-доминантном эффекте, заключающемся в нарушении нормального процессинга и/или метаболизма различных РНК. Не исключено, что протяженный повтор CUG, блокируя РНК-связывающие белки, такие как CUG-ВР (CUG-binding protein), нарушает их нормальную функцию в регуляции процессинга РНК. Изменение метаболизма тканеспецифических РНК объясняет разнообразие симптомов, наблюдаемых у больных МД1.

Экспериментальное подтверждение получила каждая из изложенных гипотез. У мышей с поврежденным геном *dmpk* наблюдалась сердечная аритмия, являющаяся одним из частых симптомов МД1 у человека. В то же время у тех же модельных животных не развивались другие симптомы заболевания, такие как миотония или катаракта. Миотония наблюдается у трансгенных мышей, в клетках которых транскрибируется мРНК с протяженным повтором CUG в нетранслируемой области. Доказано, что патологический процесс в этом случае запускается именно на уровне РНК: у животных, получивших нетранскрибируемый трансген, содержащий расширенный повтор, миотония не развивается. Относительно катаракты, то она развивается у мышей с дефектом гена *Six5*. Таким образом, этиопатогенез МД1 на молекулярном уровне обусловлен влиянием экспансии повтора СТГ на свойства мРНК, кодируемой геном *DMPK*, а также на экспрессию нескольких генов, расположенных вблизи повтора.

## Миотоническая дистрофия, тип 2 (МД2)

МД2 – генетически гетерогенное заболевание. Как и в случае МД1, повтор, подвергающийся экспансии при МД2, расположен в транскрибируемой, но не транслируемой области структурного гена *ZNF9*. Повторяющаяся единица пред-

ставляет собой тетрануклеотид ССТG. В норме длина повтора не превышает 26 тетрануклеотидов, в то время как при МД2 повтор претерпевает значительное увеличение — от 75 до 11 000 повторяющихся единиц. Среднее значение длины повтора у больных с МД2 составляет приблизительно 5000 тетрануклеотидов.

Сходство клинических проявлений МД1 и МД2, так же как и общий характер мутаций, приводящих к двум формам миотонической дистрофии, указывает на то, что экспансии транскрибируемых повторов СТG и ССТG в РНК могут быть патогенными сами по себе и вызывать мультисистемные расстройства вне зависимости от хромосомного окружения и нормальных функций генов, содержащих эти повторы. Не существует никакой функциональной гомологии между РНК-связывающим белком ZNF9 и протеинкиназой DMPK. Не обнаружено также гомологий между другими генами локусов *DM2* (*KIAA1160*, *Rab 11B*, *glycoprotein IX*, *FLJ11631*, *FLJ12057*) и *DM1*. Это свидетельствует о том, что общие клинические проявления МД1 и МД2 не связаны с нарушением функционирования генов, расположенных вблизи повторов с экспансией. По всей видимости, в основе патогенеза МД лежит способность молекул РНК с экспансией повторов CUG или CCUG образовывать вторичные структуры в виде несовершенной двунитевой РНК, препятствуя тем самым нормальному энзиматическому расщеплению, нормальному созреванию и выходу молекул в цитоплазму. Это приводит к фокальному накоплению в ядре РНК, содержащих протяженные повторы CUG или CCUG. Такое накопление молекул РНК обнаружено при обоих типах МД. Очевидно, их высокая концентрация в ядре нарушает нормальное функционирование РНК-связывающих белков, приводя к мультисистемным расстройствам.

Не исключено, что только наличия в клетке РНК с экспансией повтора CUG недостаточно, чтобы вызвать сбой функционирования биохимического аппарата. Известно, что протяженные экспансии транскрибируемого повтора СТG в локусе *SCA8* не приводят к спиноцеребеллярной атаксии, а экспансии внутриинтронного повтора СТG гена *E2-2* вовсе не ассоциированы ни с каким патологическим фенотипом. Изучение модулирующих факторов, определяющих токсичность РНК с экспансией повторов, может указать направление поиска подходов к лечению МД и СЦА8.

## Спиноцеребеллярная атаксия, тип 8 (СЦА8)

СЦА8 — прогрессирующая атаксия с атрофией мозжечка и оживленными рефлексамии. Принято считать, что заболевание вызывается экспансией повтора СТG в 3'-терминальном экзоне гена *SCA8*, экспрессирующегося, главным образом, в тканях головного мозга. При этом предполагается, что патогенными являются не все варианты экспансии повтора. До сих пор обнаружена ассоциация заболевания с аллелями, содержащими 110–250 триплетов, в то время как повторы меньшей и большей длины обнаружены только у здоровых индивидов. Еще одно отличие СЦА8 от других болезней экспансии заключается в том, что транскрипт гена *SCA8* не транслируется и, возможно, представляет собой эндогенную анти-смысловую РНК, регулирующую экспрессию других генов. Вторая мРНК, транскрибирующаяся в ориентации, обратной *SCA8* (смысловой транскрипт), кодиру-

ет белок, гомологичный продукту гена *KELCH* дрозофилы. Насколько велико значение этого белка для нормального функционирования головного мозга человека пока неизвестно.

### Спиноцеребеллярная атаксия, тип 10 (СЦА10)

СЦА10 — аутосомно-доминантное заболевание, связанное с экспансией пентануклеотидного повтора АТТСТ в интроне 9 гена *SCA10*. В норме повтор состоит из 10–22 пентануклеотидов. У больных с СЦА10 он претерпевает значительные экспансии, достигая 4500 повторающихся единиц. Патогенез заболевания не изучен.

### Спиноцеребеллярная атаксия, тип 12 (СЦА12)

СЦА12 — редкое заболевание, связанное с экспансией некодирующего повтора СAG в 5'-нетранслируемой области гена *PPP2R2B* (или *PP2A-PR55β*). Этот ген кодирует мозгоспецифическую регуляторную субъединицу фосфатазы 2A (PP2A). Несмотря на то что повтор СAG расположен вблизи консервативных промоторных элементов, влияние экспансии на транскрипцию *PPP2R2B* до сих пор не доказано. Возможно будущие исследования экспрессии и функционирования белкового продукта у больных с экспансией повтора прольют свет на механизмы патогенеза СЦА12.

### Прогрессирующая миоклонус-эпилепсия (ПМЭ)

ПМЭ — аутосомно-рецессивное дегенеративное заболевание нервной системы, характеризующееся сочетанием миоклонических гиперкинезов с эпилептическими приступами и хроническим прогрессирующим течением, ведущим к церебеллярной атаксии. Причиной ПМЭ являются мутации в гене цистатина В (*CSTB*), кодирующем ингибитор цистеиновых протеиназ. Подавляющее большинство мутаций в этом гене представляют собой крупные экспансии двенадцатинуклеотидного повтора ССССГСССССГСГ, расположенного в промоторной области гена *CSTB*. Патологическая экспансия повтора приводит к нарушению синтеза соответствующей мРНК и белкового продукта. Из нескольких возможных гипотез о механизмах влияния экспансии на синтез мРНК — нарушение пространственной организации промоторных элементов, гиперметилирование, изменение структуры хроматина и избыточное связывание репрессоров транскрипции — наибольшее подтверждение получила первая, согласно которой экспансия повтора увеличивает расстояние от сайта связывания активатора транскрипции до точки инициации транскрипции и ограничивает пространственные взаимодействия активатора с другими элементами транскрипционного комплекса.

## 4.2. БОЛЕЗНИ ЭКСПАНСИИ КОДИРУЮЩИХ ПОВТОРОВ

### Болезни экспансии полиглутаминовых трактов

Экспансия CAG-повторов, расположенных в кодирующих областях генов человека и кодирующих полиглутаминовые тракты, отмечена при девяти нейродегенеративных заболеваниях — хорее Гентингтона, спинобульбарной мышечной атрофии, дентато-рубро-паллидо-люйсовской атрофии и нескольких типах спиноцереbellарных атаксий (1, 2, 3, 6, 7 и 17 типы). Масштабы экспансии тринуклеотидных повторов при этих заболеваниях значительно меньше, чем при описанных выше болезнях экспансии некодирующих повторов. Несмотря на полное отсутствие гомологии между белками, содержащими полиглутаминовые тракты, болезни экспансии кодирующих CAG-повторов обладают несколькими общими чертами, и, по всей видимости, объединены общим механизмом патогенеза. Для всех известных заболеваний этой группы характерна прогрессирующая дисфункция нейронов, развивающаяся обычно в среднем возрасте и приводящая к выраженной дегенерации нервных клеток. Несмотря на то что все девять генов, ассоциированных с болезнями экспансии полиглутаминовых трактов, экспрессируются в подавляющем большинстве тканей организма, дегенерации в каждом конкретном случае подвержена лишь небольшая, специфическая группа нейронов. Патогенез заболеваний этой группы связан с приобретением белками, содержащими увеличенные полиглутаминовые тракты, новых функций (мутации типа «gain of function»). Сами по себе протяженные полиглутаминовые молекулы в чистом виде обладают исключительной цитотоксичностью, чем, по-видимому, и определяется общность внутриклеточных эффектов мутантных белков. Селективное же воздействие на определенные группы нейронов обусловливается аминокислотным окружением увеличенных полиглутаминовых трактов в пределах конкретных белковых молекул.

Ранние модели патогенеза болезней этой группы объясняли цитотоксичность протяженных полиглутаминовых трактов их агрегацией как между собой, так и с другими белками. Существуют две гипотезы, объясняющие механизмы такой агрегации. По одной из них, фермент трансглутаминаза связывает полиглутаминовые тракты с полипептидами, содержащими лизиловые группы, что приводит к формированию полиглутаминовых кополимеров. Согласно второй гипотезе, антипараллельные  $\beta$ -цепи полиглутаминовых повторов могут удерживаться вместе водородными связями, что вызывает мультимеризацию и агрегацию молекул.

Феномен агрегации белковых молекул, казалось бы, объясняет основные свойства болезней экспансии полиглутаминовых трактов. В первую очередь, это доминантный тип наследования: формирование агрегатов приводит к приобретению молекулами новой функции, в данном случае токсичной, поэтому достаточно мутации в одном аллеле гена, чтобы вызвать фенотипические проявления болезни. Второе характерное свойство болезней этой группы — повреждение конкретных групп нейронов, связанное, очевидно, с формированием агрегатов специфических белков, приводящее к прогрессирующей дисфункции и утрате нейронов, характерной для конкретного заболевания.

Образование белковых агрегатов подтверждается многочисленными исследованиями тканей больных людей и модельных животных, а также клеточных культур. Однако более подробное изучение показало, что образование агрегатов не является ни необходимым, ни достаточным условием развития болезней экспансии полиглутаминовых трактов. Так, у больных с синдромом Кеннеди, болезнью Гентингтона, СЦА2 и СЦА7 белковые агрегаты обнаружены не только в клетках, селективно повреждаемых при этих заболеваниях, но и в неповрежденных клетках. У модельных животных с хореей Гентингтона белковые агрегаты обнаружены в клетках без всяких признаков дегенерации, в то время как в поврежденных клетках полосатого тела их выявляемость не превышает 1%. Аналогичные наблюдения сделаны практически для всех болезней экспансии полиглутаминовых трактов.

Несмотря на отсутствие четкой корреляции между образованием белковых агрегатов и цитотоксичностью полиглутаминовых трактов, нельзя отрицать тот факт, что агрегаты обнаружены при всех болезнях экспансии полиглутаминовых трактов и являются одной из характерных цитологических характеристик этих заболеваний. Не являясь собственно причиной заболеваний, образование агрегатов может быть побочным продуктом, или даже одним из элементов, их патогенеза. Поэтому рассмотрение причин агрегации может дать ключ к раскрытию механизмов патогенеза болезней экспансии полиглутаминовых трактов.

В настоящее время причины и механизмы формирования белковых агрегатов, включающих полиглутаминовые тракты, представляются следующим образом. Экспансия глутаминового тракта приводит к изменению пространственной организации белковой молекулы, вследствие чего молекула с токсической функцией приобретает устойчивость к протеосомной утилизации. Показано, например, что мутантные молекулы атаксина-1 (92 глу) значительно более устойчивы к убиквитин-опосредованной деградации *in vitro*, чем молекулы дикого типа. Белковые молекулы с измененной пространственной организацией и увеличенным временем полураспада могут вступать в аномальные взаимодействия с другими белками, инициируя селективную дегенерацию клеток. Накопление аномальных белковых комплексов приводит к их агрегации, являющейся одним из этапов клеточного ответа, направленного на утилизацию поврежденного белка. Такая концепция подкреплена множеством экспериментальных данных. Во-первых, ингибирование протеосом приводит к усиленной агрегации мутантных белков атаксина-1 и атаксина-3 в культурах клеток. Во-вторых, в клетках больных людей и модельных животных наблюдается скопление протеосом и некоторых молекулярных шаперонов (регуляторов сборки пространственной структуры белков) в области образования белковых агрегатов. В третьих, повышение экспрессии убиквитин-связывающего фермента (ubiquitin-conjugating enzyme – UCE), приводящее к нарушению утилизации мутантного гентингтина в культуре клеток, приводит к ингибированию белковой агрегации на фоне ускорения клеточной гибели. Кроме того, скрещивание трансгенных мышей с экспансией повтора CAG в гене *SCA1* с мышами с дефектом в гене убиквитин-протеин-лигазы E3 (*Ube3A*) показало, что мыши, дефектные по обоим генам, отличались от мышей того же помета, но только с экспансией в *SCA1*, более выраженной клинической картиной заболевания при менее интенсивном образовании белковых агрегатов. Все эти экспериментальные данные свидетельствуют о том, что образование агрегатов явля-

ется, наряду с протеосомной деградацией, не причиной токсичности полиглутаминовых последовательностей, а элементом механизма детоксикации мутантных полиглутаминовых молекул.

Скопление молекулярных шаперонов в областях внутриклеточной локализации белковых агрегатов предполагает их участие в механизме уменьшения токсического присутствия мутантных полиглутаминовых последовательностей. Известно, что при участии шаперонов происходит приобретение белковыми молекулами нормальных пространственных конфигураций, убиквитин-зависимая деградация белков и подавление их агрегации. Не исключено поэтому, что внутриклеточный уровень некоторых шаперонов может непосредственно определять степень агрегации и/или скорость обмена белков, содержащих протяженные полиглутаминовые тракты. Эксперименты, проводимые на модельных животных, подтверждают потенциальную возможность использования шаперонов в терапии болезни экспансии полиглутаминовых трактов.

Важную роль в построении полной картины этиопатогенеза болезней экспансии полиглутаминовых трактов сыграло изучение внутриклеточного расположения белковых агрегатов. Для большинства характерно преимущественно внутриядерное накопление белковых агрегатов, при том что растворимые формы соответствующих белков могут иметь различную субклеточную локализацию. Принципиальное значение именно такой внутриклеточной локализации атаксина-1 показано на трансгенных мышцах, в клетках которых экспрессируется мутантный атаксин-1 (82 глу) с искусственно нарушенной функцией проникновения в ядро. В цитоплазме клеток таких мышечей наблюдается повышенная концентрация мутантного атаксина-1, однако при этом у них не развивается признаков атаксии или какой-либо другой патологии. Введение сигнальной последовательности, обеспечивающей экспорт из ядра, в мутантный гентингтин, экспрессирующийся в модельной культуре клеток, приводит к повышению цитоплазматического гентингтина, подавлению белковой агрегации и снижению гибели клеток; введение же в молекулу сигнальной последовательности ядерной локализации приводит к обратному эффекту.

После проникновения в ядро белковые молекулы, содержащие протяженные полиглутаминовые тракты, могут изменять экспрессию генов путем аномального взаимодействия с регуляторами транскрипции. Наиболее показательной в этом плане является экспансия полиглутаминового тракта в ТАТА-связывающем белке (ТВР, ТАТА-binding protein), являющаяся причиной одной из форм доминантных спиноцеребеллярных атаксий — СЦА17. Белок ТВР является одним из важнейших факторов инициации транскрипции и субъединицей транскрипционного фактора D РНК-полимеразы II (TFIID), мультисубъединичного комплекса, необходимого для экспрессии большинства генов. РНК-полимераза II представляет собой комплекс белков, достаточный для синтеза РНК на матрице ДНК, однако не способный самостоятельно узнавать промоторные последовательности генов. Для узнавания промотора необходимо несколько транскрипционных факторов, последовательно связывающихся с ним и образующих преинициаторный комплекс. Первым в цепи этих взаимодействий стоит TFIID, взаимодействие которого с промотором запускает образование преинициаторного комплекса. Основу TFIID составляет белок ТВР. В N-концевой области молекулы ТВР расположен протяженный полиглутаминовый повтор, определяющий ДНК-связывающую



активность С-концевого участка молекулы. В комплексе с ТАТА-боксом ТВР приобретает седловидную пространственную структуру, в которой вогнутая внутренняя часть контактирует с ДНК, а внешняя — с другими субъединицами комплекса TFIIID, ТВР-ассоциированными факторами транскрипции. Нарушения нормальной пространственной структуры ТВР, вызванные экспансией полиглутаминового тракта, могут изменять аффинность ТВР-ассоциированных факторов, приводя к изменению экспрессии генов и клеточной гибели.

Другим примером белков с экспансией полиглутаминовых трактов, аномально взаимодействующих с транскрипционными факторами, является гентингтин. Нормальные молекулы гентингтина не взаимодействуют с репрессором транскрипции N-CoR (nuclear receptor corepressor), в то время как молекулы с экспансией полиглутаминового тракта связывают N-CoR. В нейронах больных с хореей Гентингтона выявлена эктопическая цитоплазматическая локализация N-CoR и, по крайней мере, одного из его корепрессоров — Sin3a. В целом, показано, что в белковых агрегатах у больных с экспансией глутаминовых трактов обнаружены такие транскрипционные факторы, как CBP (CREB-binding protein), Sin3a, TAFII130 (один из ТВР-ассоциированных факторов) и собственно ТВР. Это свидетельствует о серьезных повреждениях транскрипционного аппарата клетки вследствие экспансии полиглутаминовых трактов. По всей видимости, нарушение экспрессии генов является наиболее ранним и важнейшим звеном патогенеза заболеваний этой группы.

Особая роль в этиопатогенезе болезней экспансии полиглутаминовых трактов отводится *каспазам* — цистеиновым протеазам, участвующим в процессах запрограммированной клеточной гибели. Прежде чем попасть в ядро клетки, белки, содержащие полиглутаминовые тракты, проходят стадию протеолитического расщепления. Протеолиз молекул гентингтина, андрогенового рецептора, атрофина-1 и атаксина-3 осуществляют различные каспазы. Агрегаты белков с полиглутаминовыми последовательностями, возможно, связывают каспазы и, таким образом косвенно инициируют процесс апоптоза. Ингибирование активности каспазы-1 у модельных мышей с экспансией полиглутаминового тракта в гентингтине приводит к снижению эндогенного протеолиза этого белка и замедлению развития патологического процесса. До сих пор, правда, не ясно, играет ли опосредованный каспазами запуск апоптотического процесса первичную роль в дисфункции нейронов или же это — вторичное событие, происходящее в нейронах, уже поврежденных токсичным воздействием полиглутаминовых последовательностей.

## Болезни экспансии полиаланиновых трактов

### Окулофарингеальная мышечная дистрофия (ОФМД)

ОФМД — единственное известное в настоящее время заболевание человека, связанное с изменением длины внутригенного кодирующего повтора GCG. Это наследственное заболевание с поздним дебютом, характеризующееся дисфагией и прогрессирующим птозом. Экспансия повтора приводит к увеличению полиаланинового тракта, расположенного в N-конце поли(А)-связывающего белка

РАВР2. В норме повтор GCG содержит шесть триплетов. Экспансия в пределах 8–13 триплетов приводит к аутосомно-доминантной форме ОФМД и проявляется в более тяжелой клинической форме в компаунде с аллелем, содержащим семь повторов GCG. Частота аллеля  $(GCG)_7$  в нормальной популяции составляет 2%. У гетерозигот  $(GCG)_6/(GCG)_7$  не проявляется признаков ОФМД, в то время как у гомозигот  $(GCG)_7/(GCG)_7$  развивается аутосомно-рецессивная форма заболевания. Таким образом, аллель  $(GCG)_7$  является примером полиморфизма, который может быть как в роли рецессивной мутации, так и в роли модификатора доминантного фенотипа.

Завершая рассмотрение конкретных болезней экспансии, можно отметить, что, несмотря на значительный прогресс, достигнутый в области изучения их этиопатогенеза в течение всего лишь 13 лет, наиболее принципиальные вопросы до сих пор остаются открытыми. Один из основополагающих вопросов, носящих поистине телеологический характер, — какова биологическая роль повторяющихся геномных последовательностей, а также, почему и каким образом они претерпевают столь значительные динамические изменения при некоторых заболеваниях у человека?

## Молекулярные механизмы экспансии тринуклеотидных повторов

Как видно из описания болезней экспансии, для большинства из них характерны уникальные механизмы молекулярного патогенеза. В то же время, предполагается, что механизмы собственно экспансии различных повторяющихся последовательностей могут носить универсальный характер. Это предположение основано на двух характеристиках, в той или иной степени присущих всем повторам, подверженным динамической мутации. Одна из них — наличие барьера, по достижении которого тринуклеотидный тракт теряет стабильность, вторая — скачкообразное одномоментное прибавление большого числа дополнительных копий повтора в случае экспансии.

Экспансия повторов представляет собой частный случай нестабильности повторяющихся последовательностей генома, а именно микро- и минисателлитов.

Микросателлиты являются неотъемлемой частью любого генома, они обнаружены у про- и эукариот и могут находиться как в кодирующих, так и не кодирующих участках. Благодаря высокой скорости мутирования, микросателлиты играют важную роль в эволюции геномов, создавая и поддерживая количественное генетическое разнообразие. Микросателлиты не являются пассивными генетическими элементами. Полиморфные микросателлитные последовательности, расположенные в промоторных областях генов, участвуют в регуляции транскрипционной активности. Длина полипролиновых, полиаланиновых и полиглутаминовых трактов, кодируемых микросателлитными тринуклеотидными повторами, определяет характер белок-белковых взаимодействий, в том числе с молекулами транскрипционных факторов.

Различные микросателлитные последовательности по-разному расположены в геноме. Ди-, тетра- и пентануклеотидные повторы обнаруживаются в кодирующих областях генов значительно реже, чем три- и гексануклеотидные. Такое распределение микросателлитов вполне объяснимо: изменение длины повторов

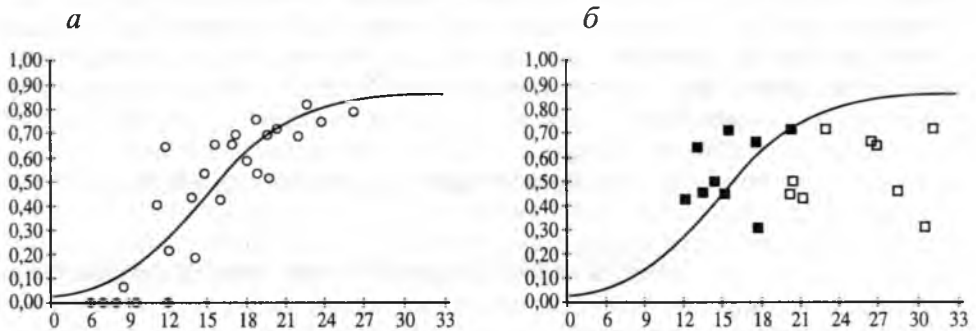
первой группы в пределах кодирующей области должно с высокой вероятностью приводить к сдвигу рамки считывания и нарушению синтеза белка. Полиморфизм же три- и гексануклеотидных повторов не приводит к сдвигу рамки считывания и, в разумных пределах, не нарушает структуры и функции кодируемого белка.

Высокая степень полиморфизма является одним из характерных свойств микросателлитных последовательностей. Существует прямая зависимость между средней длиной микросателлитного повтора и его гетерозиготностью в нормальной популяции. Показано, например, что информативность динуклеотидных СА-маркеров варьирует от 0 – для повторов с длиной 10 и менее повторяющихся единиц, до 0,8 – для повторов с длиной 24 и более единиц (рис. 33, а). Информативность маркеров, содержащих вставки нуклеотидов, нарушающих непрерывность повтора, значительно ниже, чем информативность «чистых» повторов. Как показано на рис. 33, б, информативность несовершенного повтора целиком зависит от длины его непрерывного участка.

Для некоторых болезней экспансии описана ассоциация нестабильности тринуклеотидных трактов со степенью совершенства повторов. В частности, нормальные аллели гена *SCA1* с длиной CAG-повтора свыше 21 триплета содержат от одной до трех вставок CAT, в то время как аллели с экспансией содержат только непрерывные тракты CAG.

Наряду с нормальным полиморфизмом длин, при нарушении нормального функционирования системы репарации неспаренных нуклеотидов наблюдается выраженная микросателлитная нестабильность. Такое явление описано у больных с наследственным неполипозным раком толстого кишечника. Нестабильность микросателлитов при этом охватывает геном в целом и носит неспецифический характер.

В отличие от микросателлитной нестабильности при раке толстого кишечника, нестабильность тринуклеотидных повторов при болезнях экспансии носит узлокализированный характер: повторы, предрасположенные к экспансии, расположены внутри или вблизи конкретных генов, относящихся к тому или иному заболеванию. Кроме того, при болезнях экспансии не отмечено повреждений в системе репарации ДНК. Вероятно, механизмы, приводящие к экспансии по-



**Рис. 33.** Зависимость гетерозиготности динуклеотидных повторов в нормальной популяции от их средней протяженности

По оси ординат – значения гетерозиготности. По оси абсцисс: а – число единиц в составе «чистого» повтора; б – протяженность непрерывного тракта в составе несовершенного повтора

второв, в значительной степени отличаются от таковых при микросателлитной нестабильности, связанной с глобальными дефектами систем репарации ДНК.

Ключевая роль повторов в этиологии некоторых болезней предопределена эволюцией геномов, поскольку мутации высокополиморфных последовательностей, расположенных в структурно и функционально значимых участках генов, неизбежно должны приводить к патологическим изменениям фенотипов. Но это лишь объяснение базовых предпосылок возникновения болезней экспансии. Не все повторы в равной степени предрасположены к нестабильности. Их стабильность зависит от целого ряда факторов, главными из которых являются нуклеотидный состав, характеристики хромосомного окружения и биохимический фон клетки.

Зависимость стабильности повторов от их нуклеотидного состава связана с повышенной способностью некоторых из них образовывать необычные вторичные структуры. Анализ однокитевой ДНК, содержащей тринуклеотидные повторы, показал, что повторы типа  $(CNG)_n$  образуют несовершенные шпильки, стабилизированные взаимодействием как канонических, так и неканонических уотсон-криковских нуклеотидных пар. Вероятность образования подобных шпилек тринуклеотидными повторами других типов, не предрасположенными к экспансии, значительно ниже. На этом основано предположение, что пределы длин стабильных повторов определяются энергетическим барьером образования шпилек. Это предположение не вполне подтверждено экспериментальными данными. Дело в том, что шпильки, образуемые повторами типа  $(CNG)_n$ , различаются по природе неканонических пар оснований. В связи с этим стабильность структур, образуемых разными повторами, различна и соответствует следующей шкале:  $CGG > CCG \approx CTG > CAG$ . В то же время, как показано в экспериментах *in vitro*, повтор  $CGG$ , обладая наибольшим потенциалом формирования шпилек, демонстрирует наименьший среди всех тринуклеотидных повторов уровень репликативного скольжения, которое считается одним из важнейших механизмов мутационного процесса для микросателлитных последовательностей.

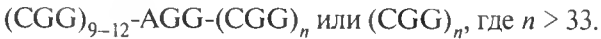
Гипотезы, механистически связывающие стабильность повтора с его длиной, не объясняют ступенчатого механизма экспансии и не характеризуют внутренних свойств повтора, определяющих грань между нормальными значениями длин, премутациями и полными мутациями. Строго говоря, четко очерченного порога длин нормальных аллелей повтора, за которым можно ожидать резкого возрастания нестабильности и возникновения премутации, не существует. В частности, для  $CGG$ -повтора гена *FMRI* описана так называемая «серая зона» — довольно широкая область перекрытия длин наибольших нормальных и наименьших премутационных аллелей. Опубликованы сообщения об аллелях схожей длины с различной стабильностью наследования в семьях. Это говорит о том, что длина повтора — важный, но не единственный фактор, влияющий на его стабильность. Обнаружение несовершенства повторов, амплифицирующихся при ряде болезней экспансии (вставки тринуклеотидов  $AGG$  в  $CGG$ -повтор *FMRI* или  $CAT$  в  $CAG$ -повтор *SCAI*) привело к рождению гипотез, связывающих стабильность повтора со степенью его «чистоты».

Большинство нормальных аллелей гена *FMRI* содержат две  $AGG$ -вставки, нарушающие чистоту  $CGG$ -повтора. Тринуклеотиды  $AGG$  занимают, как правило, место десятой и двадцатой повторяющихся единиц, т.е. структуру «нормального»

повтора можно выразить формулой



Таким образом, несовершенство повтора обнаруживается в его 5'-конце, а полиморфизм длины полярен и обеспечивается различиями в 3'-конце. Аллели с такой структурой наследуются стабильно. В нестабильно наследуемых аллелях теряются одна или обе вставки AGG, либо происходит смещение вставки:

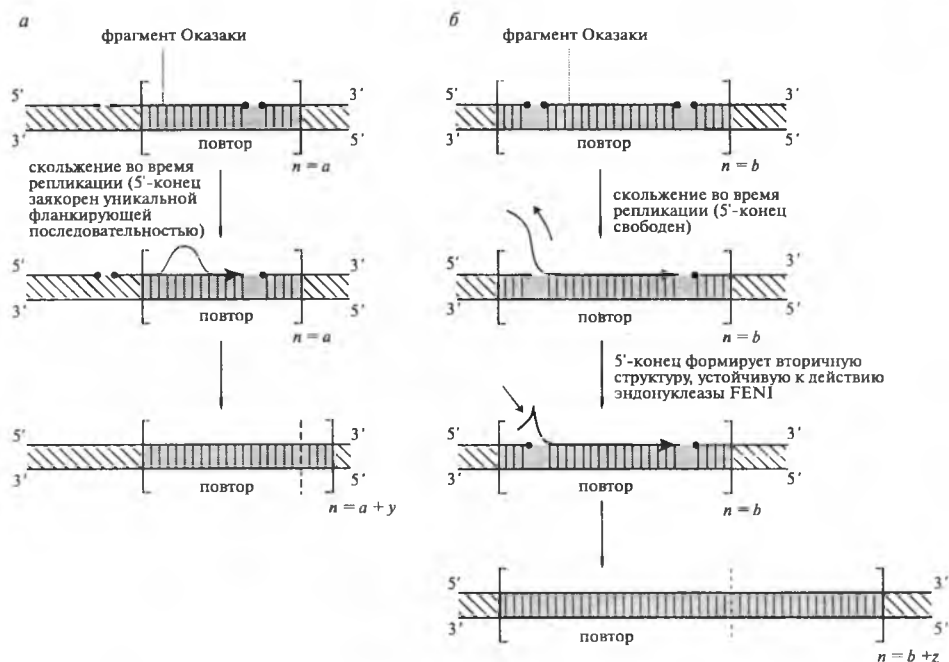


Потеря вставки может быть результатом делеции или однонуклеотидной замены А на С.

CGG-повтор содержит на 3'-конце достаточно протяженную монотонную последовательность ДНК, что может predispose к скольжению вновь синтезированной нити относительно матрицы при репликации. Модель, предложенная Eichler и др. в 1994 г., подразумевает участие фрагментов Оказаки в этом процессе. Средняя длина фрагмента Оказаки — 150–200 п.н. Не исключена вероятность, что весь фрагмент Оказаки или только его 3'-конец окажется в пределах CGG-повтора. В первом случае совершенный CGG-повтор длиной более 70 триплетов, не фиксированный по краям уникальными последовательностями, сможет свободно скользить вдоль комплементарной цепи с образованием шпилек (рис. 34, б). Во втором случае, 5'-конец фрагмента Оказаки фиксирован уникальной последовательностью гена или AGG-вставками, другой же конец также сможет скользить свободно и образовывать вторичные структуры (рис. 34, а). В обоих случаях в отсутствие эффективной репарации происходит более или менее выраженная экспансия повтора. Экспрессия ломких участков, содержащих CAG-повторы, на хромосомах дрожжей, мутантных по *rad27*, подтверждает участие фрагментов Оказаки в механизме экспансии. Показано, что образование вторичных структур на конце фрагмента Оказаки ингибирует эндонуклеазу FEN1 (гомолог белка RAD27 у человека). FEN1 метаболизирует свободный конец фрагмента Оказаки, подготавливая его к реакции лигирования с соседним фрагментом. Формируя «шпильки», тринуклеотидные повторы участвуют в образовании FEN1-устойчивой структуры на 5'-конце фрагмента Оказаки, потенцируя собственную нестабильность.

Возможная роль эндонуклеазы RAD27 была подробно изучена на дрожжевых моделях. Будучи примитивными эукариотами, дрожжи представляют собой идеальную модель для изучения последствий мутаций в генах систем репликации, репарации и рекомбинации.

В нормальных дрожжевых клетках нестабильность тринуклеотидных повторов CAG, как правило, проявляется уменьшением их длины. При этом существует зависимость стабильности длины тринуклеотидного повтора от его ориентации относительно запаздывающей цепи. В случае, если матрицей для запаздывающей цепи служит повтор CAG, он копируется относительно стабильно. При обратной ориентации повтора чаще наблюдаются изменения его длины, заключающиеся, главным образом, в ее сокращении. У дрожжей, мутантных по *rad27*, значительно повышается



**Рис. 34.** Модель экспансии тринуклеотидных повторов на запаздывающей цепи ДНК

процент экспансии CAG-повторов. При этом повышение частоты экспансий наблюдается независимо от ориентации повтора на запаздывающей цепи.

Мутации CAG-повтора в клетках с дефектом *rad27*, представляют собой делеции или инсерции протяженностью от одного до 40 триплетов. Изменения же моно- и динуклеотидных повторов в тех же клетках проявляются, в основном, инсерцией одного-двух нуклеотидов. По-видимому, такие различия обусловлены образованием CAG-повтором устойчивых шпилек.

Разрешение необычной структуры, представляющей собой непроцессированный конец фрагмента Оказаки, происходит при участии системы рекомбинационной репарации. У дрожжевых мутантов по *rad27* отмечена повышенная активность рекомбинационных процессов. При повреждении генов белков, задействованных в рекомбинации, такие дрожжи становятся нежизнеспособными. В целом, для избежания потенциальной опасности, которую представляет собой непроцессированный конец фрагмента Оказаки, необходима нормальная работа эндонуклеаз (в частности, *RAD27*), системы рекомбинационной репарации и системы репарации неспаренных нуклеотидов.

Альтернативой репликативным гипотезам экспансии служат гипотезы, связывающие нестабильность тринуклеотидных повторов с рекомбинационными процессами. С одной стороны, изменение длин tandemных повторов может быть следствием неравного кроссинговера. Однако этот механизм можно сразу исключить, поскольку показано, что экспансия не сопровождается обменом фланкиру-

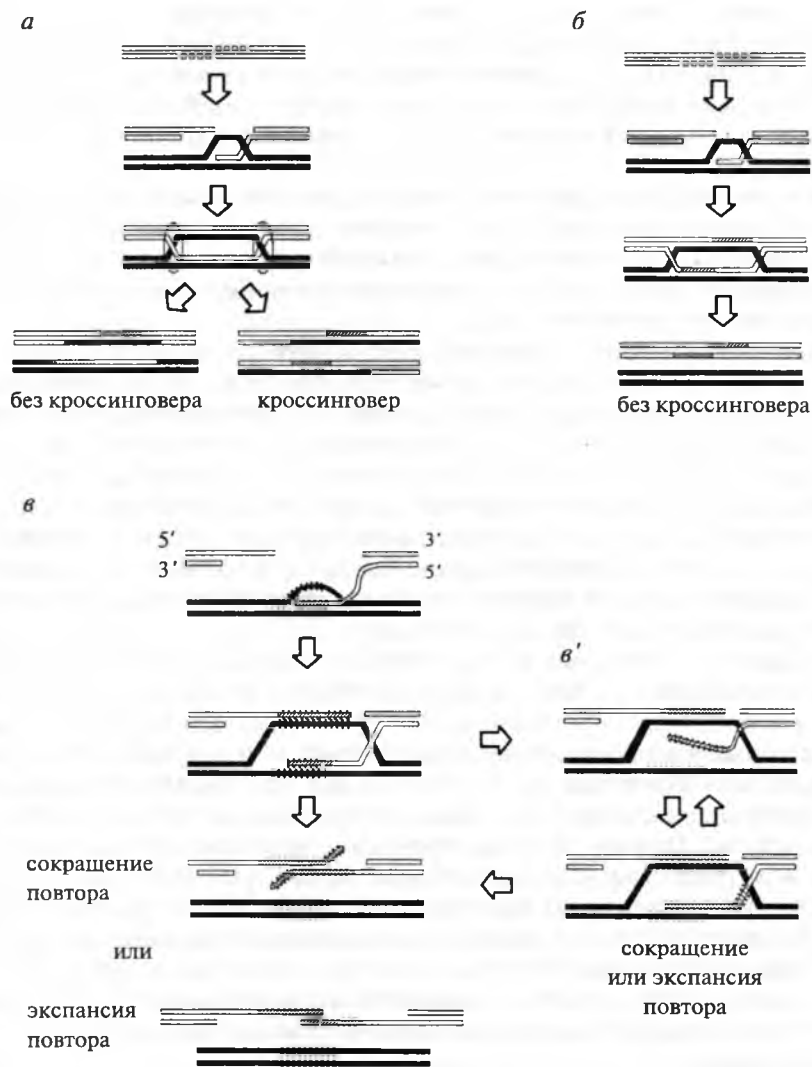
ющих маркеров. Неравный кроссинговер между сестринскими хроматидами исключить сложнее, однако, при этом в равной степени должны происходить как экспансия, так и сокращение длины повторов, что не соответствует экспериментальным данным. Наиболее обоснованная группа гипотез рассматривает в качестве причины экспансии генную конверсию, вызванную двунитевыми разрывами вблизи повторяющихся последовательностей. Как и в случае хроматидных обменов, в результате генной конверсии должны образовываться как удлиненные, так и укороченные повторы. Однако при генной конверсии это равновесие часто бывает сдвинуто, что может приводить к преобладанию аллелей с экспансией.

Генная конверсия часто, но не всегда, сопровождается кроссинговером. Взаимоотношения между этими процессами показаны на рис. 35, а. Непосредственное отношение к дестабилизации tandemных повторов может иметь генная конверсия, не сопровождающаяся кроссинговером. Для того чтобы объяснить изменение длин tandemных повторов в результате генной конверсии, не сопровождающейся кроссинговером, предложена модель синтез-зависимого отжига цепей ДНК. Согласно этой модели, две дочерние цепи ДНК могут отделяться от матрицы и взаимодействовать друг с другом (рис. 35, б). Происходящий в дальнейшем ошибочный отжиг со сдвигом в области tandemных повторов приводит к их экспансии или контракции (рис. 35, в). Вероятность такого «репарационного скольжения» в процессе мейотической рекомбинации в 800 раз выше вероятности скольжения нитей ДНК относительно друг друга в S-фазе репликации.

Не исключено, что генная конверсия стимулируется аномальной репликацией тринуклеотидных повторов. Известно, что замедление или остановка движения репликативной вилки может стимулировать рекомбинацию, которая, в свою очередь, позволяет восстановить нормальное продвижение репликативной вилки. Детально механизмы такого взаимодействия между репликацией и рекомбинацией до сих пор не изучены. Предложены две основные модели. Согласно первой, задержка репликативной вилки создает участок стабильно открытой однонитевой ДНК запаздывающей цепи матрицы. После проведения ник-трансляции этот участок представляет собой субстрат для рекомбинации с другим дуплексом ДНК. Вторая модель предполагает диссоциацию дочерних цепей ДНК после остановки репликативной вилки и их последующий отжиг друг на друга. Это приводит к образованию закрытой репликативной вилки, структура которой напоминает структуру Холидея. Последующий процессинг этой структуры с участием ферментов рекомбинации приводит к изменению длины повтора.

Роль мейотической рекомбинации в дестабилизации повторяющихся последовательностей ДНК в наилучшей степени изучена на примере минисателлитов. В частности, уже через три года после обнаружения минисателлитной ДНК в геноме человека в 1988 г. Джефрис, объясняя высокую частоту спонтанного мутагенеза этих последовательностей, предположил, что небольшие мутации, представляющие собой делеции или инсерции нескольких повторов, происходят вследствие скольжения цепей ДНК во время репликации в мейозе, в то время как причиной более значительных изменений длины повторяющейся последовательности является мейотическая рекомбинация.

В результате подробного изучения мейотической минисателлитной нестабильности были сформулированы три основных свойства этого явления. Во-первых, мутации минисателлитов полярны, т.е. прирост или сокращение длины про-



**Рис. 35.** Модели рекомбинации

В каждой из представленных моделей генная конверсия инициируется двуниевым разрывом ДНК. Стрелки указывают направление синтеза ДНК в рамках репарации двуниевых разрыва. Поврежденная («донорная») молекула показана белым цветом, матричная («реципиентная») молекула — черным, а дочерняя вновь синтезированная ДНК — серым. Области tandemных повторов обозначены вертикальными линиями; *a* — модель, предложенная Szostak и др. [1983]: разрешение двух четырехнитевых структур («структуры Холлидея», обведены кругами) приводит к генной конверсии, ассоциированной с кроссинговером в 50% случаев; *б* — модель синтез-зависимого отжига цепей. Разрешение достигается путем отделения вновь синтезированных цепей от матрицы молекулы-донора и их отжига друг на друга; *в* — перестройки tandemных повторов по модели синтез-зависимого отжига. Экспансия или сокращение повторов происходят в результате ошибочного отжига вновь синтезированных цепей; *в'* — отделение вновь синтезированной цепи и ее повторный, ошибочный, отжиг на матрице



исходят преимущественно на одном конце повтора. Во-вторых, мутантные аллели получают генетическую информацию как с обеих сестринских хроматид (интрааллельный обмен), так и с обеих гомологичных хромосом (интераллельный обмен). В-третьих, обмен фланкирующими маркерами происходит редко, что свидетельствует, что в рекомбинационном процессе кроссинговер не происходит.

Перечисленные свойства мейотической нестабильности минисателлитов вполне согласуются с моделью синтез-зависимого отжига цепей при генной конверсии (рис. 35, в): в качестве матрицы для синтеза по концам двойного разрыва используются обе матрицы, и обе вновь синтезированные нити ДНК воссоединяются в одну двунитевую молекулу.

Изучение кроссинговера, происходящего вблизи минисателлита MS32, позволило выявить область повышенной частоты мейотической рекомбинации, захватывающую 5'-концевой фрагмент повтора и распространяющуюся проксимальнее приблизительно на 200 п.о. Эта находка объясняет полярность мутационного процесса в случае мейотической минисателлитной нестабильности. По всей вероятности, в большинстве случаев возникновение двунитевых разрывов в мейозе инициируется в расположенных полярно по отношению к повтору горячих точках мейотической рекомбинации. Явление убывания генной конверсии с увеличением расстояния от горячей точки рекомбинации известно еще с 1989 г., когда оно было впервые описано у дрожжей.

При анализе соматических мутаций MS32 не было выявлено полярности делеций и дупликаций по отношению к собственно повторяющейся последовательности, что позволяет предполагать, что механизм нестабильности этого минисателлита при митозе отличен от механизма его мейотической нестабильности.

Введение двух минисателлитов (MS32 и СЕВ1) в хромосомы дрожжей показало, что эти повторы значительно стабильнее проходят митотические, чем мейотические деления. Изменения длины повторов в мейозе сопровождались как интер-, так и интрааллельной рекомбинацией. Кроме того, в этом эксперименте показано, что степень мейотической нестабильности СЕВ1 напрямую зависит от возникновения двунитевых разрывов в двух охарактеризованных горячих точках рекомбинации, одна из которых расположена дистальнее, а другая — проксимальнее повтора. При этом аллели минисателлита наследуются значительно стабильнее после перемещения его в хромосомные районы, лишенные горячих точек рекомбинации.

Описанные выше особенности мейотической и митотической нестабильности минисателлитов в значительной степени характерны и для микросателлитной нестабильности, в том числе наблюдаемой при болезнях экспансии у человека. Не исключено, что в основе этих явлений лежат общие механизмы. Вполне возможно, что репликативная модель более применима для объяснения незначительных изменений длины микросателлитов, в то время как выраженные изменения могут объясняться с точки зрения рекомбинационной модели. Участие механизма генной конверсии в крупных перестройках тринуклеотидных трактов подтверждается рядом данных по анализу наследования повторов в семьях с болезнями экспансии. Крупные делеции, не сопровождающиеся рекомбинацией ближайших фланкирующих маркеров, описаны, по крайней мере, для тринуклеотидных повторов CAG и CGG в семьях с митохондрической дистрофией и СМБ.

Приведенные теории механизмов экспансии тринуклеотидных повторов представляются достаточно обоснованными и взаимодополняющими, тем не менее, они не создают законченной картины явления. Нестабильность микросателлитных повторов вообще, и тринуклеотидных в частности, — явление естественное и закономерное для генома человека. Возвращаясь к примеру микросателлитной нестабильности при семейном неполипозном раке толстого кишечника, можно отметить, что она обусловлена не возникновением специальных механизмов, повышающих скорость мутационного процесса для микросателлитов, а нарушением механизмов репарации неспаренных нуклеотидов. Таким образом, микросателлитная нестабильность в этом случае — следствие сохранения естественным образом возникающих мутаций. Кстати, в случаях несостоятельности системы репарации неспаренных нуклеотидов отмечена и нестабильность тринуклеотидного повтора  $(CGG)_n$  в гене *FMRI*.

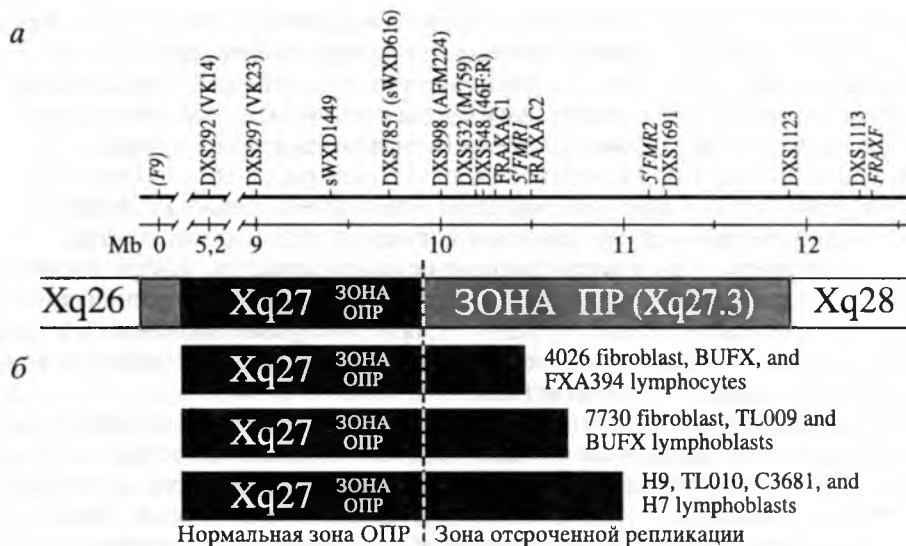
Итак, экспансия тринуклеотидных повторов получает реальный шанс на существование только при условии несостоятельности механизмов репарации. Как уже отмечалось, такие нарушения должны носить локальный характер, обеспечивая сохранение экспансии конкретных тринуклеотидных повторов. Очевидно, что причины местной несостоятельности механизмов репарации кроются в изменении свойств хромосомного окружения конкретных повторов.

Влияние хромосомного окружения на эффективность репарации мутаций тринуклеотидного повтора можно рассмотреть на примере СМБ. Прежде всего, необходимо принять во внимание известные данные о хромосомной структуре области расположения гена *FMRI* и процессах, происходящих в этом районе в норме и при СМБ.

Хромосомный сегмент Xq28 представляет собой рано реплицирующийся терминальный R-сегмент X-хромосомы протяженностью около 8 млн п.н., с высоким молярным содержанием С и G и высокой концентрацией структурных генов. Напротив, Xq27 — поздно реплицирующийся G-сегмент с низкой концентрацией генов. Xq27 разделяется на две зоны, характеризующиеся различным временем репликации. ДНК проксимальной зоны реплицируется в самом конце S-фазы, в то время как репликация в дистальной зоне, содержащей *FMRI*, происходит несколько раньше, однако также во второй половине S-фазы. Таким образом, *FMRI* не подчиняется общему правилу, согласно которому гены домашнего хозяйства располагаются в R-сегментах и реплицируются в ранней S-фазе. У больных с СМБ обнаружена зона отсроченной репликации в X(q27.3-q28), оканчивающаяся в 400 т.п.н. проксимальнее *FMRI* и граничащая с зоной очень поздней репликации в Xq27.

Как показано на рис. 36, размеры зоны отсроченной репликации неодинаковы у разных больных с СМБ, в связи с чем она имеет «плавающую» дистальную границу. Предполагается, что размеры этой области кратны размеру репликона (200—400 т.п.н.).

Известно, что задержка репликации в области ломких хромосомных участков приводит к хромосомной нестабильности. Задержка репликации, возникающая под действием индукторов хромосомной ломкости, приводит к тому, что некоторые последовательности ДНК в области ломких участков не успевают реплицироваться до перехода клетки в фазу G2. В случае СМБ, распространение зоны очень поздней репликации (ОПР) на участок геномной ДНК, содержащий стру-



**Рис. 36.** Области отсроченной репликации на Xq27 в норме (*a*) и в лимфобластоидных клеточных линиях больных с синдромом Мартина–Белл (*б*)

ктурные гены и протяженные повторяющиеся последовательности может затруднять работу системы репарации неспаренных нуклеотидов, приводя к закреплению естественным образом возникающих мутаций.

Причин расширения зоны ОНР при СМБ может быть несколько. Во-первых, эта зона может расширяться в эмбриогенезе при установлении временных параметров репликации доменов. Различия в положении дистальной границы зоны ОНР могут объясняться практическим отсутствием в Xq27.3 структурных генов (кроме *FMRI*). Присутствие жизненно важных генов обеспечило бы отрицательный отбор клеток с расширенной зоной ОНР. Такая гипотеза предполагает в определенной степени случайное определение размеров зоны ОНР (в пределах нескольких репликонов, не содержащих жизненно важных генов) и предсказывает возможное сокращение ее размеров до нормальных у больных с СМБ. Однако во всех исследованных клеточных линиях больных с СМБ зона ОНР расширена. Это может объясняться косвенным влиянием уже возникшей экспансии тринуклеотидного повтора: положительный отбор в пользу сохранения зоны ОНР, содержащей *FMRI*, как альтернатива ранней репликации протяженного CGG-повтора.

Второй вариант связывает распространение зоны ОНР с перестройками генетического материала в нормальной зоне ОНР на Xq27. Такими перестройками могут быть, например, дупликации или транслокации гетерохроматиноподобного материала. В этом случае задержка репликации *FMRI* будет представлять собой типичный пример эффекта положения.

Возможен и третий сценарий расширения зоны ОНР, отводящий главную роль *транс-*действующему фактору. Расширение зоны ОНР при СМБ напомина-

ет естественный процесс распространения зон поздней репликации на инактивированной X-хромосоме, которое, как показано, происходит по «релейному» типу: инаktivации транскрипционных доменов происходит не в одной, а в нескольких точках на X-хромосоме. Возможно, что изменение свойств транскрипта *XIST* или другого *транс-*действующего фактора с подобными функциями может привести к сдвигу границ естественных областей поздней репликации на активной X-хромосоме.

Внимательное рассмотрение всех трех предложенных сценариев заставляет задуматься об их возможном единстве и одновременности функционирования в рамках процесса, аналогичного X-инаktivации.

Инаktivацию X-хромосомы принято рассматривать в виде последовательно-сти трех процессов: инициации, распространения *in cis* вдоль X-хромосомы и закрепления в ряду последующих клеточных делений. Запуск X-инаktivации приписывается нетранскрибирующейся мРНК гена *XIST*, расположенного в центре инаktivации X-хромосомы (X inactivation center – XIC). В результате инаktivации хромосома приобретает ряд свойств, присущих транскрипционно неактивному хроматину: поздняя репликация, гипоацетилирование гистонов и гиперметилирование цитозиновых остатков CpG-динуклеотидов в промоторах генов домашнего хозяйства.

Наибольший интерес с точки зрения возникновения зоны отсроченной репликации в области X(q27.3-q28) представляет второй этап инаktivации, а именно процесс ее распространения по X-хромосоме. В 1983 г. Гартлер предложил концепцию поддерживающих, или релейных, элементов, сконцентрированных в центре X-инаktivации и ряде других локусов на X-хромосоме. Согласно этой модели, уникальная организация релейных элементов обеспечивает усиление и распространение сигнала инаktivации по всей длине X-хромосомы. В 1998 г. Лайон предложила на роль поддерживающих элементов повторы LINE-1 (LINE – long interspersed repeat elements). Элементы LINE-1, или L1, составляют семейство ретротранспозонов, обнаруженных исключительно в геномах млекопитающих, причем известно, что часть L1-элементов пребывает в активном состоянии в геноме человека и их транспозиция может приводить к нарушению структуры генов. Кроме того, LINE-элементы могут инициировать нежелательную рекомбинацию.

«Гипотеза повторов» Лайон основана, главным образом, на двух фактах. Во-первых, флуоресцентная гибридизация *in situ* демонстрирует значительное обогащение X-хромосом, по сравнению с аутосомами, повторяющимися элементами L1. Во-вторых, анализ X-аутосомных транслокаций продемонстрировал невозможность распространения сигнала инаktivации вдоль участков аутосом, обедненных элементами L1. Результаты анализа первичного сиквенса генома человека, полученного в 2000 г., подтвердили, что концентрация L1-элементов на X-хромосоме человека вдвое превышает их концентрацию на аутосомах. Более того, оказалось, что такое обогащение X-хромосомы L1-элементами произошло, главным образом, за счет наиболее молодой их фракции, возраст которой не превышает 100 млн лет.

Наибольшая концентрация эволюционно молодых L1-элементов на X-хромосоме наблюдается в области расположения X-инаktivационного центра, в X(q13-q21). Дополнительные пики их концентрации отмечены в Xq25 и Xq27.

Наименьшей оказалась концентрация молодых L1-элементов в коротком плече X-хромосомы, которое имеет аутосомное происхождение и поэтому большинство генов, расположенных в нем, не подвержено X-инактивации.

Распределение L1-элементов свидетельствует о том, что в области Xq27 может быть расположен один из промежуточных центров X-инактивации. Повышенная концентрация L1-элементов в этой области может, с одной стороны, опосредовать распространение инактивационного сигнала, с другой — создавать предпосылки для всевозможных перестроек с участием ретротранспозонов. Происходящие, как следствие, изменения инактивационных свойств прилежащих хромосомных районов могут выражаться, в частности, в изменении временных параметров репликации. Такой вариант объяснения распространения зоны ОПР при СМБ является в значительной степени гипотетическим. Вместе с тем он логично вписывается в общую картину явлений, сопровождающих нестабильность повтора CGG в гене *FMRI*, и не исключено, что экспериментальные данные подтвердят общие положения такого варианта развития событий.

Не отрицая роли внутренних свойств тринуклеотидного повтора в определении степени его стабильности, современная теория экспансии должна выяснять, прежде всего, внешние причины, способствующие изменению его длины в ряду поколений. Эти причины следует искать в локальной недостаточности системы репарации неспаренных нуклеотидов. Сочетание внутренних свойств тринуклеотидного повтора, предрасполагающих к его нестабильности, особенностей его хромосомного окружения и биохимического фона клетки и приводят в конечном итоге к экспансии в области конкретных генов и фенотипическим проявлениям соответствующего генетического дефекта.

### 4.3. ДНК-ДИАГНОСТИКА БОЛЕЗНЕЙ ЭКСПАНСИИ

Экспансия tandemных повторов, расположенных в разных генах, приводит к появлению различных, в большинстве случаев строго определенных, патологических фенотипов, однако сам характер мутации, заключающийся в значительном увеличении длин повторяющихся геномных последовательностей, позволяет проводить ДНК-диагностику заболеваний этой группы однотипными методами.

Существуют два принципиальных подхода к выявлению экспансии коротких повторяющихся последовательностей. Экспансии в пределах 150 повторов регистрируются методом ПЦР. Методической основой ДНК-диагностики в этих случаях служит амплификация полиморфного тринуклеотидного повтора с праймеров, фланкирующих область повтора, с последующей визуализацией продуктов амплификации в агарозном или полиакриламидном геле (рис. 37). Это относится к подавляющему большинству болезней экспансии кодирующих повторов. Размеры длин повторов при этих заболеваниях обычно не превышают 100 триплетов, за исключением хореи Гентингтона и спиноцеребеллярной атаксии 7-го типа.

Болезни экспансии некодирующих последовательностей обычно сопровождаются более значительными изменениями длин повторов. Размеры трактов ча-



**Рис. 37.** Определение длины полиморфной области тринуклеотидного повтора методом ПЦР с радиоактивно меченными праймерами (радиоавтограф)

сто достигают в этих случаях нескольких сотен и даже тысяч повторяющихся единиц. Современные технологии ПЦР пока не в состоянии обеспечить точное выявление столь протяженных участков повторяющейся ДНК, поэтому основным методом ДНК-диагностики болезней экспансии некодирующих повторов в настоящее время остается блот-гибризационный анализ ДНК, гидролизованной эндонуклеазами рестрикции. Экспансия повтора в этом случае определяется по наличию фрагментов рестрикции повышенной молекулярной массы.

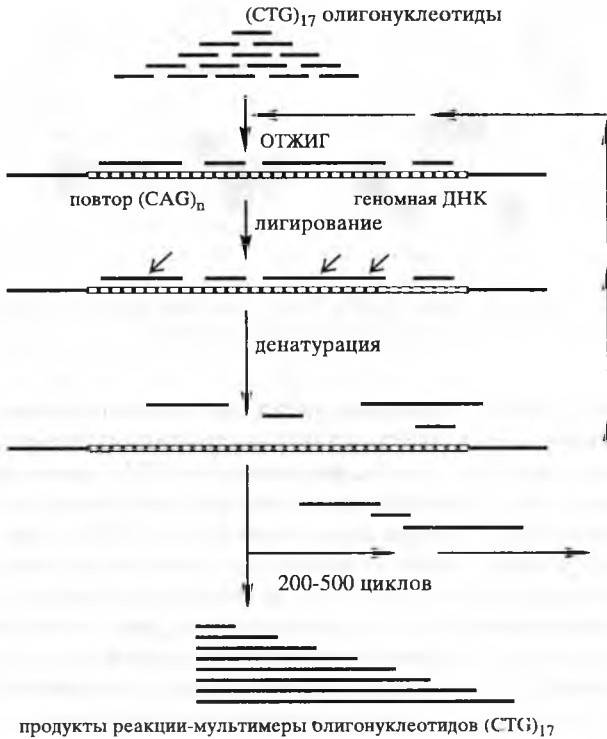
Для выявления возможной экспансии тринуклеотидных повторов в случаях, когда анализ уже известных локусов не позволяет установить точный диагноз, используется технология RED (repeat expansion detection — детекция экспансии повторов), позволяющая проводить скрининг всего генома на наличие потенциально патогенных экспансий.

Принцип метода заключается в отжиге олигонуклеотидов, представляющих собой тринуклеотидные повторы длиной 15–20 триплетов, в комплементарных областях генома с последующим лигированием соседних олигонуклеотидов и денатурацией их с матрицы. Цикл отжига — лигирования — денатурации повторяется несколько сот раз, пока не накапливается достаточное для визуализации количество продукта, длина которого приблизительно соответствует максимальной длине искомого повтора в анализируемом образце (рис. 38). Технология RED была успешно применена в конце 1990-х гг. для выявления причин нескольких типов спиноцереbellарных атаксий.

Кроме определения длины тринуклеотидных повторов, основой для молекулярной диагностики болезней экспансии может служить выявление сопряженных изменений генетического материала или белковых продуктов. Такими изменениями могут быть аномальное метилирование ДНК в области повторов, нарушение синтеза белкового продукта (РНК) или синтез белка (РНК) с измененными свойствами (рис. 39).

Поскольку принципиальные подходы к ДНК-диагностике болезней экспансии являются едиными, рассмотрим их подробнее на примере одного из распространенных наследственных заболеваний — синдрома Мартина–Белл (СМБ).

В настоящее время наиболее широко применяется лабораторная диагностика СМБ, основанная на гибридизации по Саузерну с использованием различных систем ДНК-зондов, которые представляют собой фрагменты экзона 1 гена *FMR1*, расположенные вблизи гипервариабельной области гена (рис. 40, а).

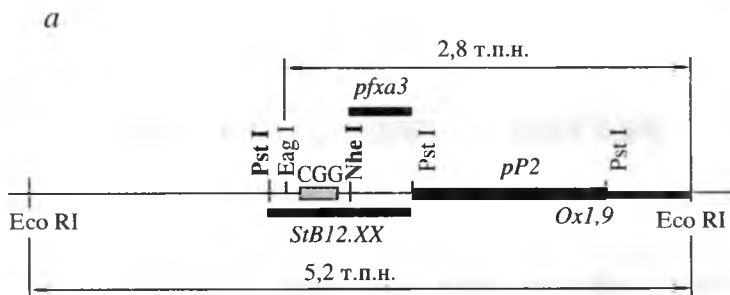


**Рис. 38.** Принцип метода RED

200–500 циклов отжига–лигирования–денатурации олигонуклеотидов приводят к накоплению продуктов реакции в виде мультимеров различной длины, кратной длине исходных олигонуклеотидов



**Рис. 39.** Принципы лабораторной диагностики болезней экспансии



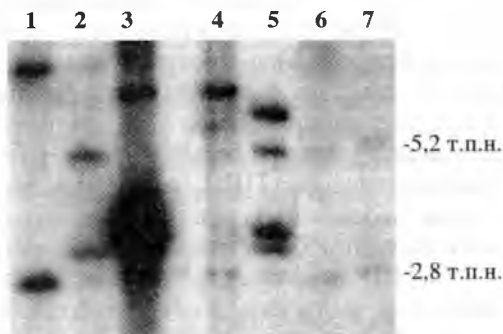
**Рис. 40, а.** Схема расположения наиболее распространенных зондов для ДНК-диагностики СМБ относительно гипервариабельной области гена *FMRI* (CGG-повтор) и сайтов узнавания некоторых эндонуклеаз рестрикции

ДНК-зонд *pP2* аналогичен зонду *StB12.3*

*б*

**Рис. 40, б.** Анализ ДНК здоровых и больных индивидов, обработанной рестриктазами *HindIII* и *EagI*, методом гибридизации по Саузерну с ДНК-зондом *Oxl.9*

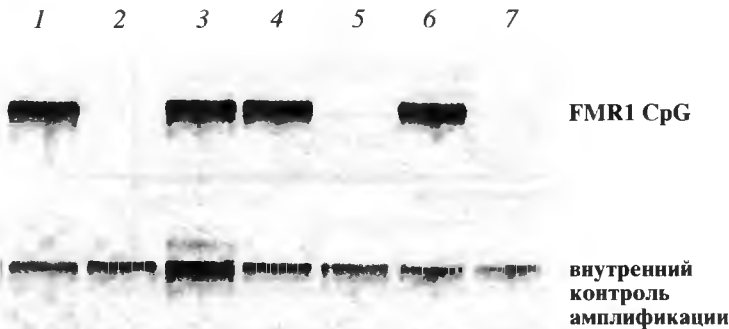
1, 2, 4, 6 – матери больных СМБ (в дорожке 6 – шмер, соответствующий полной мутации); 3, 5 – больные мужского пола; 7 – здоровая женщина



Гибридизация с этими зондами образцов ДНК, обработанных соответствующими эндонуклеазами рестрикции, в том числе метилчувствительными, позволяет не только определить размеры амплифицированного участка, т.е. число CGG-повторов, но и оценить статус метилирования CpG-островка промоторной области гена (рис. 40, б). Системы ДНК-зондов широко используются как для дифференциальной диагностики СМБ, в том числе и пренатальной, так и для выявления бессимптомного носительства, т.е. состояния премутации гена *FMRI*.

При высокой надежности метод гибридизации по Саузерну имеет ряд недостатков. Это дорогой и трудоемкий метод, связанный с использованием радиоактивных изотопов и позволяющий получить результат анализа не ранее, чем через неделю после получения образца биологического материала. Поскольку лабораторный тест на СМБ должен быть, наряду с кариотипированием, рутинным скрининговым тестом для всех больных с несиндромальной умственной отсталостью, возникла необходимость в разработке простого в исполнении и дешевого метода, позволяющего в короткие сроки обследовать большое количество больных. Таким методом стала метилчувствительная полимеразная цепная реакция





**Рис. 41.** ПЦР-тест на метилирование промоторной области гена *FMR1*

Матрицей для ПЦР служили образцы геномной ДНК, предварительно обработанной метилчувствительной рестриктазой *HhaI*. 1 – здоровая женщина. 2, 5, 7 – здоровые мужчины. 3, 4, 6 – пациенты мужского пола с СМБ

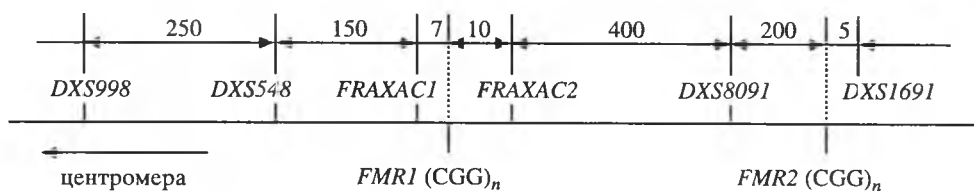
(*МЧ-ПЦР*). МЧ-ПЦР основана на гидролизе образца ДНК рестриктазой, чувствительной к метилированию, с последующей амплификацией фрагмента промотора гена *FMR1* с праймеров, фланкирующих сайты узнавания этой рестриктазы. В норме ДНК промотора гена *FMR1* неметилирована и подвергается гидролизу метилчувствительными рестриктазами, что приводит к разрушению матрицы для ПЦР и отсутствию продукта амплификации. Промотор гена *FMR1* с полной мутацией экспансии повтора *CGG* метилирован и не подвергается гидролизу метилчувствительными рестриктазами, что выражается в сохранении матрицы и наработке продукта ПЦР. Таким образом, анализ результатов теста исключительно прост и основан на констатации наличия или отсутствия сигнала амплификации в известной области на электрофореграмме (рис. 41).

МЧ-ПЦР позволяет получать результат теста в короткие сроки (при необходимости, в частности, в случаях пренатальной диагностики, — на следующий день после получения образца), его применение требует наличия в лаборатории минимального набора оборудования и реактивов для ДНК-диагностики, себестоимость метода на порядок ниже себестоимости блот-гибридизации по Саузерну.

ПЦР-анализ метилирования промотора гена *FMR1* не позволяет проводить диагностику носительства среди родственников больных. Поэтому, чтобы максимально исключить метод блот-гибридизации из протокола лабораторной диагностики СМБ, для выявления носительства используется анализ наследования фланкирующих и внутригенных полиморфных микросателлитных маркеров в отягощенных семьях. Информативность системы из шести маркеров — *DXS998*, *DXS548*, *FRA3AC1*, *FRA3AC2*, *DXS8091* и *DXS1691* — в семьях с СМБ превышает 99% (рис. 42).

С учетом преимуществ методов, основанных на технологии ПЦР, *современный протокол лабораторной диагностики СМБ* включает следующие этапы:

1. Исследование кариотипа пробанда для исключения хромосомной патологии, не имеющей отношения к СМБ.
2. Анализ состояния метилирования промоторной области гена *FMR1* у больных без выраженной хромосомной патологии: методом МЧ-ПЦР для больных



**Рис. 42.** Схема расположения полиморфных микросателлитных маркеров для косвенной ДНК-диагностики СМБ

Расстояния указаны в т.п.н.

мужского пола и методом блот-гибридизации по Саузерну для больных женского пола.

3. Анализ ДНК родственников выявленных больных с СМБ для выявления носителей премутаций и полных мутаций. Метод выбора — анализ сцепления по фланкирующим микросателлитным маркерам.

4. Пренатальная диагностика, которая может осуществляться на любом сроке беременности методом анализа сцепления по фланкирующим микросателлитным маркерам. В случае мужского пола плода возможно проведение экспресс-диагностики методом метилчувствительной ПЦР на ДНК из клеток амниотической жидкости или лимфоцитов периферической крови плода.

В целом, на примере СМБ хорошо прослеживается постепенное вытеснение в ДНК-диагностике болезней экспансии дорогостоящего и трудоемкого метода блот-гибридизации более простыми и экономически оправданными методами, основанным на различных вариантах ПЦР, что позволяет сделать анализ быстрым и доступным, а также проводить более или менее широкий скрининг наиболее распространенных болезней экспансии.

## Заключение

Изучение молекулярного этиопатогенеза болезней экспансии повторяющихся последовательностей имеет теоретическое и большое практическое значение. С одной стороны, довольно высокая частота известных на сегодняшний день болезней экспансии, по всей видимости, возрастет в ближайшие годы в связи с открытием новых патогенных экспансий повторов. При этом вклад новых моногенных болезней этой группы в общую частоту будет скорее всего незначительным, поскольку большинство описанных в последние годы экспансий приводит к относительно редким нейродегенеративным заболеваниям. Скорее всего, совокупная частота болезней экспансии может значительно возрасти за счет выявления модулирующего действия повторов различной длины на экспрессию патологических фенотипов полигенной этиологии. Наиболее интенсивные работы по идентификации таких повторов — модификаторов ведутся в области генетики поведения. Одним из популярных направлений является поиск ассоциации с экспансией различных повторов при шизофрении. Однако, несмотря на значительные усилия, достоверных ассоциаций пока не выявлено. В то же время тот факт, что вариабельные повторы могут модифицировать уровень экспрессии и свойства тех или иных транскриптов, не вызывает сомнения и в ближайшее время мож-

но ожидать всплеска информации, касающейся влияния повторов на экспрессию физических и поведенческих фенотипов.

Теоретическое значение исследования болезней экспансии связано с тем, что амплифицированные повторяющиеся последовательности представляют собой удобную естественную модель для изучения поведения генетического материала в необычных условиях на всех уровнях организации — от физико-химических свойств протяженных монотонных трактов ДНК до структуры и функции хроматина и глобальных регуляторных геномных механизмов. Это делает изучение болезней экспансии исключительно актуальной задачей и обуславливает его значительный вклад в развитие биомедицины.

Экспансия повторяющихся последовательностей как класс мутаций уже заняла положенное место в номенклатуре изменений генетического материала. Соответствующие разделы появились в учебниках генетики. Никого не удивляют сообщения об идентификации новых болезней экспансии. Тем не менее исследования, проводимые в этой молодой и интенсивно развивающейся области молекулярной генетики, наверняка преподнесут нам еще много неожиданных сюрпризов.

## Литература

*Cummings C.J., Zoghbi H.Y.* Fourteen and counting: unraveling trinucleotide repeat diseases // *Hum. Mol. Genet.* 2000. Vol. 9. № 6. P. 909–916.

*Eichler E.E., Holden J.J.A., Popovich B.W.* et al. Length of uninterrupted CGG repeats determines instability in the FMR1 gene // *Nature Genet.* 1994. Vol. 8. P. 88–94.

*Sutherland G.R., Baker E., Richards R.I.* Fragile sites still breaking // *Trends in Genet.* 1998. Vol. 14. P. 501–506.

*Zhong N., Ju W., Pietrofesa J.* et al. Fragile X “gray zone” alleles: AGG patterns, expansion risks, and associated haplotypes // *Am. J. Med. Genet.* 1996. Vol. 64. P. 261–265.

*Jin P., Warren S.T.* Understanding the molecular basis of fragile X syndrome // *Hum. Mol. Genet.* 2000. Vol. 9. № 6. P. 901–908.

# Геномный импринтинг и наследственная патология у человека

М.В. Немцова, Д.В. Залетаев

В последнее время, когда картирование и клонирование генов наследственных заболеваний практически стало технологической задачей, а частота и спектр мутаций в них легко определяются с помощью целого арсенала современных молекулярно-биологических методов, интерес исследователей все больше привлекают патологии, которые не связаны непосредственно со структурными нарушениями генов. Исследования функциональных нарушений генов, вовлеченных в генез наследственных заболеваний и обусловленных аномалиями регуляции на уровне ДНК и РНК, будут занимать доминирующие позиции в ближайшие годы.

Для описания механизмов, которые могут контролировать экспрессию генов, не будучи сами под непосредственным контролем генов, предложено название «эпигенез». Одним из механизмов эпигенетической регуляции экспрессии генов является *геномный импринтинг*, а число наследственных болезней, связанных с нарушением этой регуляции, увеличивается с каждым днем. Механизмы импринтинга, несмотря на значительное количество гипотетических моделей, во многом остаются неизученными. Но тот факт, что импринтинг является консервативным механизмом регуляции экспрессии генов, убедительно говорит о его универсальности и необходимости его исследования в норме и при патологии.

## 5.1. ОБЩИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ОБ ИМПРИНТИНГЕ

Термин геномный импринтинг (ГИ) впервые был предложен в 1960 г. для объяснения необычного поведения половых хромосом у мушки *Sciara Coprophila*. У этого организма зигота содержит два набора аутосом и три половых хромосомы, две из которых отцовские. В течение эмбриогенеза одна отцовская X-хромосома теряется у эмбрионов обоих полов (у самки — AmApXmXp) и обе отцовские X-хромосомы — у эмбрионов самца (AmApXm). Возможно это связано с тем, что хромосомы каким-то образом маркируются (или импринтируются) перед слиянием гамет в соответствии со своим родительским происхождением. Оба родителя передают потомкам совершенно идентичные гены, но в гаметогенезе они могут быть по-разному маркированы, вследствие чего действие этих генов будет неодинаковым. ГИ относят к эпигенетическим явлениям, подчеркивая этим наследуемость изменений генной активности, обусловленной родительским происхождением.

ждением, а не структурной перестройкой генетического материала. Таким образом, ГИ можно определить как эпигенетический механизм регуляции экспрессии гомологичных генов в процессе развития организма в зависимости от родительского происхождения гена, хромосомы или генома.

Импринтинг на уровне целого генома демонстрируют эксперименты по трансплантации пронуклеусов у мышей. Материнские или отцовские пронуклеусы могут быть идентифицированы, удалены или вновь введены в зиготу. Были сконструированы андрогенетические ( $2p.0m$ ) и гиногенетические ( $2m.0p$ ) зиготы, где  $p$  — отцовский геном, а  $m$  — материнский. И те и другие зиготы были практически нежизнеспособны, но если их развитие все-таки продолжалось, то у них имели место совершенно различные аномалии. У гиногенетических эмбрионов, достигших наибольшего развития, в теле эмбриона наблюдались незначительные аномалии, однако их плаценты и желточные мешки были сильно недоразвитыми. А у наиболее развитых андрогенетических эмбрионов, наоборот, желточные мешки и плаценты были почти нормальными, а тела — мелкими и слаборазвитыми. Поскольку у гиногенетических, андрогенетических и нормальных эмбрионов нуклеотидные последовательности ДНК не различались (были использованы инбредные линии), сделан вывод, что гены были каким-то образом модифицированы и несут отпечаток той особи, от которой они унаследованы. Среди генов, унаследованных от отца, не экспрессировались некоторые гены, отвечающие за развитие эмбриона, а гены, необходимые для формирования желточного мешка и плаценты, оказались неактивными, если были получены от матери.

Патологией, демонстрирующей импринтинг целого генома у человека, является истинный пузырный занос — быстро малигнизирующаяся ткань хориона abortивного плодного пузыря. Цитогенетическими и молекулярно-генетическими методами было показано, что ткань пузырного заноса является продуктом андрогенеза, т.е. возникает при оплодотворении яйцеклетки, лишенной хромосом матери, двумя сперматозоидами  $22 + X$ . Несмотря на наличие полноценного диплоидного набора, ранний эмбриогенез таких андрогенетических зигот протекает аномально, ткани собственно эмбриона вообще не формируются, однако бурно разрастается трофобласт. В случае двойного набора материнских хромосом (гиногенетическая зигота) развивается тератома — эмбриональная опухоль, включающая все три эмбриональных слоя и отсутствие плацентарной ткани. Следовательно, у человека, как и у мыши, геном отца обеспечивает развитие плаценты, в то время как геном матери обеспечивает раннее развитие эмбриональных структур. Будучи генетически импринтированными, только материнский или только отцовский геном не в состоянии обеспечить нормальное эмбриональное развитие.

Аномалии развития, свидетельствующие о ГИ, выявлены в случаях триплоидии у человека. Так, триплоидный плод — андронд ( $2p + 1m$ ), характеризуется большой головой, маленьким веретенообразным телом, синдактилией, отставанием в росте и развитии; развивается большая кистозная плацента — частичный пузырный занос. У гиноида ( $2m + 1p$ ) — плацента недоразвита, эмбрион и плод не развиваются и представлены недифференцированной клеточной массой. Это также подтверждает неэквивалентность функционирования мужского и женского геномов.

На хромосомном уровне импринтинг был выявлен при получении мышинных транслокационных гибридов, которые имели в хромосомном наборе фрагменты

или целые хромосомы одного (материнского или отцовского) происхождения — так называемая однородительская дисомия (ОРД). Термины «однородительская дисомия», или «изодисомия», предложены Эриком Энжелом в 1980 г. и обозначают типы анеуплоидии в половых клетках млекопитающих, которые свидетельствуют, что у диплоидного потомка обнаруживаются два локуса от одного родителя. Дисомии, изученные для хромосом мыши 1, 3, 4, 8, 9, 10, 13, 15, 16, 18 и 19 отцовского или материнского происхождения, не вызывали каких-либо отклонений от нормального развития, тогда как однородительская дисомия по хромосомам 2, 6, 7, 11 и 17 сопровождалась серьезными отклонениями от нормального внутриутробного развития, которое в большинстве случаев заканчивалось гибелью эмбрионов или новорожденных мышей. Следовательно, по некоторым хромосомам (или их частям) требуется вклад обоих родителей для нормального развития. Так, например, отцовская дупликация и материнская делеция проксимальной части короткого плеча хромосомы 6 фенотипически не проявляется, а материнская дупликация и отцовская делеция — летальны на ранних сроках эмбрионального развития. Летальный исход показан для эмбрионов с материнской дисомией по участкам хромосом 2p и 7p, с отцовской дисомией — по 17p и 17q. При любой дисомии районов хромосом 2q, 7q развитие прекращается на ранних стадиях. Весьма показательна ОРД для хромосомы 7 мыши: в случае материнской дисомии размеры новорожденных мышей составляли 70% от нормы, а при отцовской дисомии — превышали норму (130%).

ОРД по целым хромосомам или их фрагментам выявлены при анализе наследственной патологии и у человека. Материнская ОРД по хромосоме 2 сопровождается признаками дисэмбриогенеза и отставанием в развитии; отцовская дисомия по длинному плечу хромосомы 6 (q23;q24) обнаружена при неонатальном диабете; материнская дисомия по длинному плечу хромосомы 7 установлена при муковисцидозе, а при синдроме Сильвера—Рассела — по короткому плечу хромосомы 7 в области гена *GRB10*. При синдроме Видеманна—Беквита в ряде случаев выявляются частичная трисомия хромосомы 11 (локус 11p15) отцовского происхождения или же сбалансированные транслокации с точками разрыва в критическом районе материнской хромосомы. Материнская ОРД по хромосоме 14 сопровождается гипотонией, небольшими черепно-лицевыми аномалиями, акромикрией, сколиозом, задержкой физического, моторного и умственного развития, а отцовская — сильной умственной отсталостью и скелетно-мышечными аномалиями. Материнская или отцовская ОРД по хромосоме 15 вызывает синдромы Прадера—Вилли (СПВ) и Ангельмана (СА), соответственно. ОРД по длинному плечу хромосомы 20 в области гена *GNAS1* отцовского происхождения может приводить к псевдогипопаратирозу. Отцовская ОРД по X-хромосоме в одном случае сопровождалась дисгенезией гонад и низким ростом.

Примерами патологий, возникающих в результате наличия импринтинга, является ряд наследственных синдромов, обусловленных хромосомными делециями или частичной моносомией. Пациенты с синдромом Шерешевского—Тернера (моносомия X-хромосомы), у которых обнаружена потеря отцовской X-хромосомы, достаточно сохранны умственно, а если утрачена материнская X-хромосома, то либо эмбрион спонтанно abortируется в первом триместре беременности, либо пациенты имеют различные аномалии сердечно-сосудистой системы, более выраженные крыловидные складки на шее и другие аномалии. При СПВ и СА

принципиальное значение имеет происхождение хромосомы, в которой произошла делеция области 15 (q11.2–q13). Синдром Вильямса сопровождается большей задержкой физического и умственного развития и микроцефалией, если делеция произошла в локусе материнской хромосомы 7q11.23. Были описаны случаи синдрома ДиДжорджи в результате делеции материнской хромосомы 22 (22q11.2) и синдрома «кошачьего крика» в результате делеции отцовской хромосомы 5 (5p15.3).

Описана неслучайная потеря фрагментов хромосом в злокачественных опухолях — так называемая *потеря гетерозиготности* (ПГ). В частности, в нейробластомах ПГ выявляется по району хромосомы 1 (1p36) преимущественно материнского происхождения, а гиперамплификация *N-Мус*, локализованного в районе 2p24, преимущественно происходит с отцовской хромосомы.

В настоящее время определено четыре кластера генов, подверженных импринтингу, и локализованных в локусах: 6q24 (отцовская экспрессия генов *HUMAI*, *ZAC* и преимущественно материнская экспрессия *ZAC-AS*), 7q32 (отцовская экспрессия генов *MEST* и  $\gamma$ 2-*COP*), 11p15 (материнская экспрессия генов *H19*, *HASH2*, *KvLQT1*, *IMPT1*, *IPL* и отцовская экспрессия генов *IGF2*, *LIT1* и *MTR1*) и 15 (q11.2–q13) (см. ниже). Сейчас в геноме человека известно не менее 30 импринтированных генов, имеющих тканеспецифическую моноаллельную экспрессию, хотя предполагается, что их может быть от 100 до 200. Во всяком случае, целый ряд заболеваний по характеру наследования и проявлениям может возникать вследствие импринтинга. Пациенты с болезнью Гиршпрунга, как правило, наследуют мутацию в гене *RET* (10q11.2) от матери. Наблюдаются более тяжелые проявления нейрофиброматоза типа 2, когда мутация в гене *SCN* (22q12) наследуется от матери. Шизофрения проявляется в более тяжелых формах, если наследуется по отцовской линии. Предполагается, что синдром де Ланге (3q26) может быть связан с материнским импринтингом. Семейная гипертрофическая кардиомиопатия в основном передается по материнской линии. Спинномозговая грыжа в два раза чаще передается матерями, чем отцами. Псориаз проявляется в более тяжелой форме, если наследуется от отца. Есть сведения, что синдром Туретта и поликистоз почек проявляются раньше и в более тяжелых формах, если наследуются от матери. Эпилепсия в более тяжелой форме наследуется от матери. Для ряда заболеваний, связанных с экспансией тринуклеотидных повторов, характерно так называемое генетическое ожидание. Среди них наиболее распространенными являются синдром Мартина—Белл (Xq27.3), миотоническая дистрофия (19q13.3), хорея Гентингтона (4p16.3). Гены всех трех заболеваний содержат районы высокополиморфных триплетных повторов. Показано, что амплификация этих повторов происходит во время гаметогенеза. Амплификация тринуклеотидного повтора CGG при синдроме Мартина—Белл и повтора CTG (миотоническая дистрофия) происходит во время оогенеза, в то время как амплификация повтора CAG при хорее Гентингтона — во время сперматогенеза. Изменения в геноме, связанные с этими синдромами, непосредственно затрагивают нуклеотидную последовательность, тем не менее, их условно относят к геномному импринтингу, так как соответствующие локусы претерпевают изменения, проходя через женский либо мужской гаметогенез.

## 5.2. МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК КАК ЭПИГЕНЕТИЧЕСКАЯ МЕТКА

Метилирование ДНК вовлечено в широкий круг биологических процессов, которые включают регуляцию экспрессии тканеспецифических генов, клеточную дифференцировку, инактивацию X-хромосомы, регуляцию структуры хроматина, репликацию ДНК, латентный период у вирусов, канцерогенез и старение. В основе ГИ лежит этот же механизм, позволяющий генам экспрессироваться только моноаллельно. Эпигенетическая метка должна удовлетворять двум основным критериям. Во-первых, она должна поддерживаться в течение многих клеточных делений строго на одной хромосоме и, во-вторых, должна быть лабильной в определенные моменты развития герминальных клеток, когда она стирается и восстанавливается, но уже с учетом нового родительского происхождения — это необходимо для правильного функционирования гена в следующем поколении. Лучшим кандидатом на эпигенетическую метку является обратимая ковалентная модификация ДНК посредством метилирования, когда цитозиновый остаток в СG-динуклеотиде метилируется в позиции N<sub>5</sub> пиримидинового кольца. Такая модификация стабильно поддерживается в ряду клеточных делений, что обеспечивается ферментами ДНК-метилтрансферазами. Тотальное деметилирование генома зиготы, устраняющее профиль, сформированный в исходных половых клетках, происходит между первыми делениями до стадии имплантации бластоцисты. Остатки 5-метилцитозина могут удаляться из ДНК благодаря активности недавно обнаруженной гликозилазы или ДНК-деметилазы. Это наиболее вероятный кандидат на роль фермента, осуществляющего глобальное деметилирование генома. Он способен узнавать метилированные CpG-динуклеотиды, трансформировать 5-метилцитозин в цитозин, не нарушая целостности ДНК, и осуществлять деметилирование на значительном участке нуклеотидной последовательности. После имплантации бластоцисты начинается процесс метилирования *de novo*, профиль которого в целом сохраняется в соматических клетках взрослого индивидуума.

Обнаружение зависимости между снижением/выключением активности гена и метилированием его промоторной области является еще одним веским доводом в пользу того, что такая модификация ДНК может служить эпигенетической меткой. При этом метилирование вызывает и другие эффекты, способствующие более полной инактивации гена. В частности, метильные группы нарушают взаимодействия ДНК — белок, так как выступают в большую бороздку ДНК, тем самым препятствуя связыванию специфических транскрипционных факторов, метилированные районы ДНК могут специфически связывать белки (MDBP), являющиеся транскрипционными репрессорами и, наконец, могут опосредованно модифицировать хроматин. Процесс заключается в связывании метилированными районами транскрипционного репрессора MeCP2, который является составной частью белковых комплексов, содержащих корепрессоры и деацетилазу гистонов. Деацетилирование гистонов приводит к более плотной упаковке нуклеосом и вызывает полную инактивацию гена. Таким образом, метилирование ДНК является наиболее реальным кандидатом на роль эпигенетической метки, достаточно хорошо изучено, характерно практически для всех импринтированных генов и локусов, хотя нельзя исключить, что существуют еще какие-то, пока неизвестные механизмы.



### 5.3. СИНДРОМЫ ПРАДЕРА–ВИЛЛИ И АНГЕЛЬМАНА КАК МОДЕЛЬ ИЗУЧЕНИЯ ПАТОЛОГИИ ИМПРИНТИНГА

#### Клиническая характеристика синдрома Прадера–Вилли (СПВ)

Впервые СПВ был описан в 1956 г. Основными диагностическими признаками этого заболевания являются: ожирение, мышечная гипотония, низкий рост, гипогонадизм, умственная отсталость различной степени выраженности и признаки дизэмбриогенеза (долихоцефалия, миндалевидный разрез глазных щелей, гипертелоризм, эпикант, микрогнатия, рыбообразный рот, высокое нёбо, диспластичные ушные раковины, акромикрия, аномалии дерматоглифики и др.). Для пренатального периода характерна слабая подвижность плода в отличие от нормально протекающей беременности, вследствие чего вес ребенка при рождении не превышает 2,8 кг. Неонатальному периоду свойственны гипорефлексия, скудное питание из-за ослабления глотательного и сосательного рефлексов. В результате глубокой гипотонии может возникнуть асфиксия. Затруднения при кормлении постепенно проходят к шести месяцам. В течение первых 12–18 мес. развивается неконтролируемая гиперфагия, которая вызывает множество соматических и физиологических проблем, в частности, ожирение и сердечную недостаточность. Больные отстают в росте и развитии. Вторичные половые признаки, если и появляются, то слабо выражены у обоих полов. Гипопигментация выявляется у 75% больных. Продолжительность жизни составляет 25–30 лет. Взрослым больным свойственны эмоциональная лабильность, пониженные моторная активность и познавательная способность, гиперфагия и различная степень умственной отсталости. Необходимо отметить, что СПВ характеризуется широким клиническим полиморфизмом, встречаются неклассические формы заболевания. Поэтому необходимо дифференцировать СПВ от синдромов Коэна, Опица–Фриаса, Барде–Бидля, Олбрайта и умственной отсталости, сцепленной с ломкой X-хромосомой. Частота синдрома в различных популяциях составляет 1:10 000–20 000 новорожденных. Основная масса случаев возникает спорадически, но встречаются и семейные формы. Риск повторного рождения ребенка с СПВ зависит от генетической причины заболевания в каждом конкретном случае.

#### Клиническая характеристика синдрома Ангельмана (СА)

Впервые СА был описан в 1965 г. и получил название синдрома «счастливой куклы». Основными диагностическими признаками являются: микробрахицефалия с уплощенным затылком, большая нижняя челюсть, приоткрытый рот с выступающим языком, макростомия, редко растущие зубы, гипопигментация. Из неврологических проявлений наиболее характерны: задержка умственного и моторного развития, атаксия, гипотония, судорожная готовность, гиперрефлексия и гиперкинезия. Приступы неконтролируемого смеха, хлопанье в ладоши и специфическое выражение лица предопределили название синдрома. В 1982 г. синдром получил настоящее название. Диагностика в первые годы жизни затрудне-

на, а в последующие годы синдром необходимо дифференцировать от синдромов Петерса–Пласа, Ретта и тригоноцефалии Опица. Гипопигментация отмечается у 40% больных и схожа с таковой при СПВ. Частота синдрома в популяции составляет 1:20 000.

## 5.4. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ХРОМОСОМНОГО РАЙОНА 15 (q11-q13)

Наиболее частым хромосомным дефектом при СА и СПВ является интерстициальная делеция критического района 15(q11-q13) протяженностью 4 м.п.н., который содержит кластер импринтированных генов (2–3 м.п.н.) и неимпринтированную область (1–2 м.п.н.). Критическая для СПВ область занимает примерно половину района 15 (q11-q13) и содержит четыре гена, кодирующих белки (*NDN*, *ZNF127*, *MAGEL2*, *SNRPN*), а также семь генов, кодирующих нетранслируемые РНК: *ZNF127AS*, *PAR5*, *PARSN*, *IPW*, *PAR1*, *C15orf2*, *PWCR1* (рис. 43). Все перечисленные локусы экспрессируются моноаллельно на хромосоме отцовского происхождения. Моноаллельная экспрессия на материнской хромосоме показана для двух генов – *UBE3A* и *ATP10C*, расположенных в дистальной части района 15(q11-q13).

Важно отметить, что для каждого из импринтированных генов в районе 15 (q11-q13) показаны либо тканеспецифическая экспрессия (*SNRPN*, *NDN*, *ZNF127*), либо тканеспецифический импринтинг (*UBE3A*) в мозге.

Неимпринтированная область находится в дистальной части критического района и содержит несколько биаллельно функционирующих генов: локус *P* (отвечает за пигментацию кожи и глаз), гены *GABRB3*, *GABRA3*, *GABRG3* (кодируют субъединицы рецептора гамма-аминомасляной кислоты – ГАМК-А) и ген *HERC2*.

Наличие генов, кодирующих нетранслируемую РНК, является общей характерной особенностью всех известных импринтированных хромосомных доменов. В районе СА/СПВ обнаружено несколько таких генов (*ZNF127AS*, *PAR5*, *PARSN*, *IPW*, *PAR1*, *C15orf2*, *PWCR1*, *UBE3A-AS*). Некоторые из транскриптов синтезируются на антисмысловой цепи соответствующих генов, что обозначено аббревиатурой AS (от *antisense*). Например, на антисмысловой цепи гена *ZNF127*, кодирующего белок, в противоположном направлении транскрибируется нетранслируемая РНК – *ZNF127AS*, причем и *ZNF127*, и *ZNF127AS* активны на отцовской хромосоме. Антисмысловая РНК обнаружена также для гена *UBE3A*, но, в отличие от *ZNF127*, транскрипция *UBE3A* и *UBE3A-AS* происходит на разных родительских хромосомах. *UBE3A-AS* экспрессируется на отцовской хромосоме лишь в тех тканях мозга, где *UBE3A* подвержен импринтингу и активен только на материнской хромосоме. В остальных тканях, где *UBE3A* экспрессируется биаллельно, *UBE3A-AS*-транскрипт не обнаруживается.

Функциональное назначение некодирующих и антисмысловых РНК в клетке недостаточно изучено. Поскольку они часто являются продуктами импринтированных генов, высказывается предположение о том, что они участвуют в механизмах импринтинга и обеспечивают моноаллельную экспрессию некоторых генов.

Известно немало примеров перекрывающихся генов эукариот, считывающихся в противоположных направлениях. В некоторых случаях один из таких генов содержится внутри интрона другого гена, и иногда перекрываются их экзоны. Высказываются разные предположения о назначении такого типа организации генов. Согласно некоторым из них, антисмысловые РНК, благодаря образованию РНК-РНК дуплексов, могут ингибировать трансляцию на смысловых РНК, стабилизировать смысловую РНК-цепь, участвовать в процессах экспорта мРНК из ядра, а также обеспечивать механизмы сплайсинга.

Подобный механизм конкурентной транскрипции скорее всего обеспечивает тканеспецифичный импринтинг гена *UBE3A*. На возможную роль некодирующей РНК в механизмах импринтинга указывает обнаружение так называемых BD-экзонов (кодирующих ДНК-связывающий домен) в 5'-фланкирующей области локуса *SNRPN* (рис. 43). В результате альтернативного сплайсинга гена *SNRPN* с BD-экзонами образуется некодирующий транскрипт. Делеции или точковые мутации в BD-экзонах приводят к нарушению экспрессии импринтированных генов на материнской хромосоме и становятся причиной СА. Предполагается, что некодирующая РНК выполняет какие-то регуляторные функции в импринтированных районах.

Подобно другим импринтированным кластерам, существуют значительные различия между отцовской и материнской копиями критического района 15 (q11-q13) в отношении ДНК-метилования нескольких сайтов (рис. 43). Обнаружено несколько районов дифференциального метилирования (РДМ), основные из которых – локусы *D15S63 (PW71)*, *D15S9 (ZNF127)* и *SNRPN*.

Наиболее детально аллельное метилирование изучено для гена *SNRPN*. Он содержит 2 РДМ: в промоторной области и в интроне 7. Во всех исследованных соматических тканях промоторная область гена *SNRPN* метилирована на материнской хромосоме. На активной отцовской копии метилирование отсутствует. В интроне 7 наблюдается обратный характер аллельного метилирования.

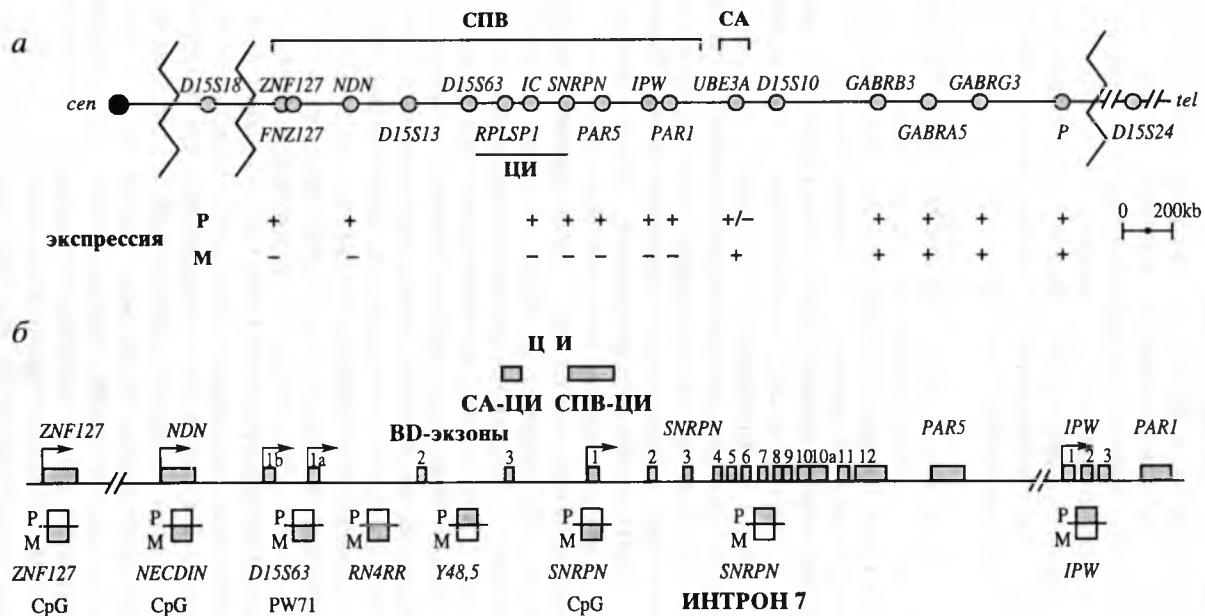
Локусы критического района, характеризующиеся различным метилированием родительских аллелей, являются важными диагностическими маркерами при исследованиях ДНК у пациентов с СА и СПВ.

## 5.5. ФОРМЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ПАТОЛОГИИ, ВЫЗЫВАЮЩИЕ СИНДРОМЫ ПРАДЕРА-ВИЛЛИ И АНГЕЛЬМАНА

### Делеции критического района 15 (q11-q13)

Наиболее частой причиной возникновения СПВ и СА становится протяженная (до 4 м.п.н.) делеция критического района 15 (q11-q13). Эта делеция обнаруживается у 70–75% пациентов и возникает в популяции с частотой 0,67 – 1,0 на 10 000 новорожденных, что позволяет считать ее самой распространенной хромосомной перестройкой у человека.

СПВ и СА – классические примеры наследственных заболеваний, возникновение которых зависит от родительского происхождения хромосомных пере-



**Рис. 43.** Молекулярная организация хромосомного района 15(q11;q13)

*а* – генетическая карта района 15(q11;q13) (положение генов обозначено серыми кружками; точки разрыва при стандартных делециях обозначены зигзагом; транскрипция родительских аллелей: + экспрессируется; – не экспрессируется);

*б* – характер аллельного метилирования локусов критического района 15(q11;q13). Экзоны генов показаны серыми прямоугольниками, сайты инициации транскрипции каждого гена – стрелками. ЦИ имеет два альтернативных сайта инициации транскрипции. Отсутствие метилирования показано незакрашенными прямоугольниками, наличие метилирования обозначено покрашенными прямоугольниками

строек. Причиной СПВ становится делеция критического района на отцовской хромосоме 15, а СА возникает в случае делеции той же области на ее материнском гомологе.

Спорадический характер возникновения делеции критического района хромосомы 15 (q11-q13) при СПВ и СА, ее стандартная (4 м.п.н.) протяженность в 95% случаев, строгая локализация точек разрыва и одинаковая частота при обоих синдромах указывают на то, что возникновение делеции происходит в гаметогенезе родителей (одинаково часто в овогенезе и сперматогенезе) и объясняется мейотической нестабильностью этого хромосомного района.

Имеются сообщения о вовлечении района 15 (q11-q13), помимо делеций, в инвертированные дупликации (тетрасомия), дупликации (трисомия), несбалансированные транслокации (моносомия), сбалансированные транслокации и инверсии.

В последнее время стали известны некоторые особенности молекулярной организации критического района 15 (q11-q13), которые способствуют процессу гомологической рекомбинации, что придает ему мейотическую нестабильность и объясняет высокую частоту aberrаций в данной хромосомной области. Существуют два кластера точек разрыва при делециях, картированных проксимальнее *ZNF127* (см. рис. 43), причем на кластер, расположенный ближе к центромере, приходится больше точек разрыва (~65%). Дистальный кластер точек разрыва локализован теломернее локуса *P*, отвечающего за пигментацию организма. Молекулярными методами было показано, что делетируемый район (4 м.п.н.) фланкирован низкокопийными повторяющимися экспрессирующимися MN7-последовательностями (относятся к END-повторам), которые обеспечивают рекомбинационные события в мейозе и приводят к хромосомным перестройкам.

Установлено, что MN7-повторы представляют собой дублицированные фрагменты («дубликоны») гена *HERC2* (HEct domain and RCC1 domain protein 2). Полноразмерный функционирующий ген *HERC2* расположен теломернее локуса *P* и кодирует гигантский белок, который у человека состоит из 4834 аминокислот и имеет молекулярную массу 528 кДа. Он является предшественником двух белков — HECT, гомологичным С-области белка E6-AP и белка-регулятора конденсации хроматина RCC1. В кластерах делеционных точек разрыва на хромосоме 15 предположительно содержится не менее 8 повторяющихся единиц и, по крайней мере, две копии повтора расположены на участке 16p11.2. Протяженность каждой из повторяющихся единиц составляет 50–200 т.п.н., а их гомология с исходным геном-родоначальником *HERC2* варьирует от 90 до 99%. Таким образом, предковый *HERC2* в результате нескольких последовательных дупликаций дал начало мультипсевдогенному семейству. Считается, что активная транскрипция END-псевдогенов способствует процессам гомологической рекомбинации и неравного кроссинговера между повторяющимися последовательностями в районе 15 (q11-q13) подобно тому, как у дрожжей «горячими точками» митотической и мейотической рекомбинации становятся только активные промоторные области. Установлено, что делеции при СПВ и СА могут возникать в гаметогенезе в результате внутри- или межхромосомных перестроек. Внутрихромосомные делеции происходят благодаря образованию большой петли размером 3–4 м.п.н.

Дозовый блот-гибридизационный анализ, выполненный по Саузерну с зондом на 3'-район *HERC2* образцов ДНК двух пациентов с СА и восьми с СПВ,

имеющих стандартную (4 м.п.н.) делецию критического района, показал двукратное снижение интенсивности сигнала по сравнению с контролем; следовательно, по крайней мере, 3'-часть гена находится внутри делетируемой области. Эти данные привели к заключению, что точка разрыва у пациентов со стандартной делецией находится внутри гена, а единственная функционально полноценная копия этого гена находится на другой родительской хромосоме 15. У экспериментальных мышей, несущих мутации в обоих аллелях гена *HERC2*, наблюдаются значительное сокращение продолжительности жизни, нервные расстройства (тремор, прерывистая походка), стерильность самцов и сниженная плодовитость самок.

Таким образом, делеции при СПВ и СА возникают в гаметогенезе в результате внутри- или межхромосомных перестроек.

## Однородительская дисомия

Вторая возможная причина развития СПВ и СА – однородительская дисомия (ОРД), т.е. наследование обоих гомологов хромосомы 15 от одного из родителей. Отцовская ОРД становится причиной заболевания у 3–5% пациентов с СА, а материнская ОРД наблюдается в 25% случаев СПВ.

В силу функциональной неравнозначности отцовской и материнской хромосом 15 наличие у ребенка двух структурно полноценных хромосом материнского происхождения не обеспечивает нормального развития и, как и в случае отцовской делеции, приводит к развитию СПВ. Аналогично отцовская ОРД приводит к развитию СА.

Предложено несколько механизмов формирования ОРД у человека:

1) комплементация гамет – случайное слияние двух гамет с разнонаправленной анеуплоидией по одной и той же хромосоме. Например, слияние диплоидной по хромосоме 15 яйцеклетки с нуллисомным по этой же хромосоме сперматозоидом может привести к развитию СПВ у ребенка;

2) коррекция трисомии до дисомии, т.е. слияние одной дисомной и одной нормальной гамет и формирование трисомной зиготы с элиминацией в последующих делениях дробления той хромосомы, которая содержалась в нормальной (моносомной) гамете;

3) коррекция моносомии до дисомии возможна при слиянии нормальной и нуллисомной гамет с образованием моносомной зиготы и последующей дупликацией моносомной хромосомы.

Перечисленные механизмы обеспечивают возникновение ОРД двух типов:

1) *гетеродисомию* – наследование двух разных гомологичных хромосом от одного из родителей (возникает по механизмам 1 и 2);

2) *изодисомию* – наследование от одного из родителей двух копий одной и той же хромосомы. Этот тип ОРД возникает путем коррекции моносомии до дисомии.

Доказательством механизма коррекции трисомии до дисомии служат два случая трисомии хромосомы 15, выявленных в результате пренатальных исследований ворсин хориона. После рождения у двоих детей наблюдалась клиническая картина СПВ, и материнская ОРД была подтверждена анализом ДНК.

У большинства пациентов с СПВ, имеющих ОРД, наблюдается гетеродисомия, возникающая по второму механизму вследствие нерасхождения материнских хромосом в первом делении мейоза.

Известно, что вероятность нерасхождения хромосом при делении созревания ооцита повышается с увеличением возраста женщины. Это согласуется с наблюдением, что возраст матери на момент рождения ребенка с ОРД, как правило, превышает 30 лет. Развитие большинства трисомных зигот спонтанно прерывается, но в случае потери одного из гомологов хромосомы 15 на ранних стадиях развитие может быть продолжено. Если произошла потеря отцовской хромосомы (вероятность составляет 1/3), то у ребенка будет материнская гетеродисомия хромосомы 15 и фенотип СПВ.

Отцовская ОРД при СА, как правило, является изодисомией и возникает путем коррекции моносомии до дисомии.

Поскольку во всех трех возможных механизмах развития ОРД первым событием является нерасхождение хромосом в первом мейотическом делении созревания ооцита, можно ожидать, что вероятность возникновения ОРД при СА так же, как и при СПВ, зависит от возраста матери. Это подтверждается обнаружением нескольких случаев отцовской изодисомии при СА, когда возраст матерей превышал 30 лет.

Так как зиготы, несущие моно- и трисомию по хромосоме 15, нежизнеспособны, удвоение единственной хромосомы при моносомии и потерю лишней хромосомы при трисомии можно считать «аварийными» мерами, после которых становится возможным дальнейшее развитие эмбриона.

Несмотря на то что и материнская ОРД при СПВ, и отцовская ОРД при СА возникают вследствие нерасхождения хромосом в овогенезе, ОРД у пациентов с СПВ, как уже было сказано, встречается значительно чаще. Скорее всего, это объясняется большей выживаемостью зигот с трисомией по хромосоме 15 и ранней гибелью моносомных зигот. Кроме того, потеря лишней хромосомы в трисомной клетке, по-видимому, является более вероятным событием, чем удвоение хромосомы в моносомной клетке на ранней стадии развития. Представляют интерес исследования ОРД по другим хромосомам человека и влияние возраста матери на их возникновение. Поскольку все аутосомные моносомии и большинство трисомий у человека летальны, происходит отбор тех зигот, в которых одним из описанных способов была восстановлена дисомия. ОРД по другим хромосомам человека, кроме 15, могут быть летальными, сопровождаться аномалиями фенотипа или фенотипически не проявляться.

## Мутации центра импринтинга

В 1993 г. были обобщены сведения об особой группе пациентов (не более 5%) с клиническим диагнозом СА и СПВ, у которых не было показано типичных делеций (4 м.п.н.) района 15 (q11-q13) и не было обнаружено ОРД, однако, как и в случае ОРД, наблюдался одинаковый характер метилирования обеих родительских копий этой критической области. Позднее выяснилось, что экспрессия импринтированных генов (*SNRPN*, *ZNF127*, *PAR-1*, *PAR-5*, *IPW*, *PWCR1*, *C15orf2* в случае СПВ) на обеих родительских хромосомах также была одинаковой и соответствовала характеру метилирования. Следовательно, характер метилирования и экспрессии генов на одной из родительских хромосом у таких пациентов был изменен на обратный (инвертирован). Это объяснялось нарушением переключения (замены) эпигенотипа хромосом в гаметогенезе одного из родителей вслед-

ствии ошибок импринтинга. Так, если в сперматогенезе отца на его материнской хромосоме не происходит замены «женского» импринта на «мужской», то в следующем поколении, после объединения с материнским геномом, возникнет состояние, аналогичное материнской ОРД и функционально равнозначное отцовской делеции, которое будет сопровождаться фенотипом СПВ. Нарушение установления «женского» эпигенотипа на отцовских хромосомах в овогенезе матери приведет к развитию СА у потомства.

Молекулярно-генетические исследования у таких пациентов показали, что «ошибки импринтинга» часто сопровождаются микроделециями особой регуляторной области, расположенной в пределах СА/СПВ кластера импринтированных генов. Эта область протяженностью 100 т.п.н. была названа *центром импринтинга* (ЦИ) (см. рис. 43).

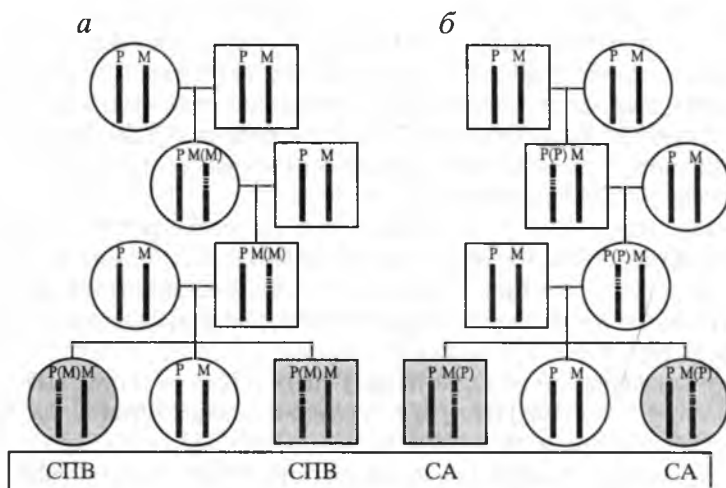
Поскольку наименьшие области перекрытия всех делеций ЦИ при СА и СПВ не совпадают, в составе ЦИ принято различать две компоненты. Микроделеции в проксимальной части этого района (ЦИ-СА), находящейся на 25–30 т.п.н. центромернее промоторной области гена *SNRPN*, наблюдаются у пациентов с СА. Минимальный район перекрытия всех делеций ЦИ при СА имеет длину 1,15 т.п.н. и содержит ВД-экзоны, которые обнаруживаются в составе одной из возможных сплайс-форм гена *SNRPN* и кодируют нетранслируемую РНК. Важно заметить, что экспрессия ВД-экзонов, обеспечивающих установление «женского» эпигенотипа, наблюдается только в овогенезе и, подобно гену *SNRPN*, только на отцовской хромосоме. Гиперметилирование ВД-локусов показано на обоих родительских хромосомах.

При СПВ встречаются микроделеции второй, дистальной, компоненты ЦИ (ЦИ-СПВ), которая представлена промоторной областью и экзоном 1 гена *SNRPN*. Наименьший район перекрытия микроделеций ЦИ при СПВ составляет 4,3 т.п.н.

Сами по себе делеции ЦИ не сопровождаются развитием патологического фенотипа и могут обнаруживаться у здоровых родителей и других родственников пациента. Анализ родословных тех семей с СПВ и СА, где выявлены делеции ЦИ, свидетельствует о том, что эти делеции могут наследоваться без фенотипических проявлений через несколько поколений людей одного и того же пола (рис. 44). Например, делеции ЦИ-СА, области, ответственной за установление материнского эпигенотипа, могут наследоваться через несколько поколений от отца к сыну до тех пор, пока эта делеция не будет передана дочери. В этом случае дочь будет здорова, но в ее овогенезе импринт отцовской хромосомы не заменится на материнский. Ребенок этой женщины (независимо от пола) с вероятностью 50% получит от матери хромосому с ошибочным отцовским эпигенотипом и будет иметь клинику СА. Аналогично, возможно скрытое наследование делеций ЦИ-СПВ в ряду поколений от матери к дочери, но риск рождения больного ребенка с СПВ у мужчины-носителя такой делеции также составляет 50%.

В одной из работ было исследовано 17 пациентов с СА и 13 пациентов с СПВ, у которых, согласно микросателлитному анализу, присутствовали обе родительские копии критического района (т.е. не было делеций и ОРД), но характер метилирования и экспрессии генов на обоих гомологах соответствовал только отцовскому (при СА) или только материнскому (при СПВ) эпигенотипу. Следовательно, имели место «ошибки импринтинга», однако ни у одного из этих пациентов





**Рис. 44.** Наследование мутаций центра импринтинга, приводящих к невозможности переключения импринта в герминальных клетках

*a* – СПВ: если мутация возникает во втором поколении у женщины, то она фиксирует материнский импринт М(М), который передается без фенотипических последствий следующему поколению; у мужчины мутация блокирует стирание женского импринта, поэтому 50% его потомков будут иметь СПВ и эпигенотип Р(М); *б* – СА: отцовский импринт Р(Р) фиксируется и может передаваться без аномалий фенотипа через мужчин, но в герминальных клетках женщины мутация не позволяет изменить эпигенотип М(Р), что приводит в 50% случаев к рождению ребенка с СА

Условные обозначения: Р – отцовская хромосома; М – материнская хромосома

методом блот-гибридизации по Саузерну с ДНК-зондами к области ЦИ не было выявлено делеций. Аллельное метилирование локусов критического района у родителей было нормальным. С целью выявления небольших делеций и точковых мутаций в ЦИ-СА и в ЦИ-СПВ был предпринят скрининг ВД-экзонов и области ЦИ-СПВ с помощью гетеродуплексного анализа. При последующем секвенировании указанных районов, помимо нескольких полиморфизмов, не было найдено никаких структурных изменений. Анализ методом однонитового конформационного полиморфизма (SSCP) области ЦИ-СПВ, составляющей 4,3 т.п.н., при использовании 11 пар праймеров у трех таких пациентов с СПВ не выявил точковых мутаций.

Таким образом, нарушение смены эпигенотипа в гаметогенезе не всегда сопровождается делециями ЦИ, поэтому следует различать как минимум две подгруппы пациентов с аномалиями импринтинга: с делециями ЦИ и без делеций ЦИ. Между ними имеются существенные отличия.

Все случаи СПВ и СА вследствие ошибок импринтинга, но без делеций ЦИ, являются спорадическими. Действительно, имеются сообщения о том, что здоровые сибсы могут наследовать ту же самую хромосому, которая у больного брата или сестры несет ошибочный эпигенотип. Следовательно, риск повторного рождения больного ребенка в таких семьях крайне мал (в случае делеции ЦИ он равен 50%). Целесообразность выделения двух групп пациентов на основе нали-

чия или отсутствия делеций ЦИ объясняется необходимостью расчета риска повторного рождения больных детей, от которого зависит тактика генетического консультирования семьи. Высказывается предположение о том, что спорадические случаи ошибок импринтинга без делеций ЦИ являются результатом случайных сбоях в многоэтапном процессе становления эпигенотипа, которые могут быть связаны со структурными нарушениями в других (помимо ЦИ) *цис*-регуляторных последовательностях или с дефицитом пока неизвестных внехромосомных *транс*-действующих факторов.

Было прослежено наследование хромосомы с «неправильным» импринтом в ряду трех поколений. У пациентов, имеющих делеции ЦИ-СПВ, мутантная хромосома всегда наследуется от матери отца, а в случае делеции ЦИ-СА хромосома с обращенным эпигенотипом всегда происходит от деда по материнской линии. Эти наблюдения полностью согласуются с первоначальным представлением о роли ЦИ в переключении родительского эпигенотипа во время гаметогенеза. Ошибки импринтинга в спорадических случаях СПВ без делеций ЦИ, как и при делециях ЦИ-СПВ, возникают только на хромосомах, которые были унаследованы от матери отца. Однако неожиданным оказалось то, что в двух из семи информативных спорадических случаев СА без делеций ЦИ аномально импринтированная хромосома происходила от бабушки по материнской линии.

Изложенные наблюдения прояснили вопрос о механизмах функционирования ЦИ и позволили высказать предположение о том, что причиной СПВ становится невозможность устранения старого материнского импринта в сперматогенезе отца, а к возникновению СА приводит нарушение установления нового эпигенотипа в овогенезе матери.

Предложена следующая схема функционирования центра импринтинга (рис. 45). Непосредственным объектом регуляции для ЦИ являются лишь те гены, которые в норме активны на отцовской хромосоме, в том числе и локус, кодирующий антисмысловой транскрипт гена *UBE3A*. Экспрессия *UBE3A* регулируется через функцию антисмыслового транскрипта *UBE3A-AS* (*antisense*), т.е. активация *UBE3A* на материнской хромосоме является следствием подавления транскрипции антисмысловой цепи на этой же хромосоме. Согласно данной модели, прямым назначением ЦИ-СПВ является установление (в гаметогенезе) и поддержание (в соматических тканях) активной транскрипции генов на отцовской хромосоме. В случае наследования делеции ЦИ-СПВ от отца возникает фенотип СПВ и наблюдается биаллельная транскрипция *UBE3A* как следствие инактивации *UBE3A-AS* на отцовской хромосоме. Роль ЦИ-СА по этой схеме сводится к отмене функции ЦИ-СПВ в овогенезе и сдерживанию тех процессов, которые реализуются под контролем ЦИ-СПВ в сперматогенезе. Поэтому в результате делеции ЦИ-СА становится невозможной инактивация «отцовских» генов на материнской хромосоме (в том числе *UBE3A-AS*), а значит и активация гена *UBE3A*. При наследовании такой делеции от матери наблюдается биаллельная экспрессия «отцовских» генов и биаллельное «молчание» гена *UBE3A*.

Благодаря этой модели становится понятным, почему делеции ЦИ при СА никогда не распространяются на область ЦИ-СПВ, но в то же время делеции ЦИ у некоторых пациентов с СПВ перекрывают ЦИ-СА район. Незаконная активация «отцовских» генов на материнской хромосоме в результате делеции ЦИ-СА возможна только при условии сохранности ЦИ-СПВ. Изложенная гипотеза тре-

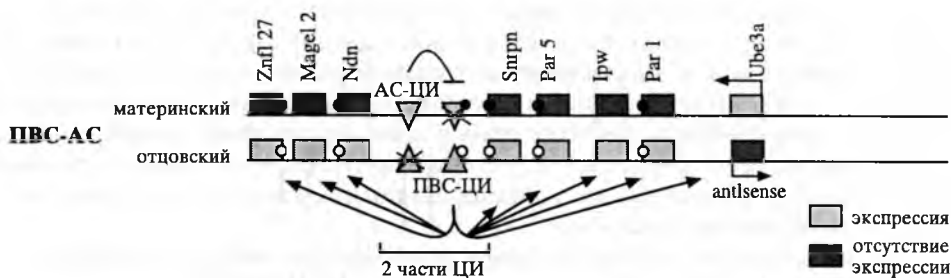


Рис. 45. Схема функционирования центра импринтинга

бует дополнительных экспериментальных подтверждений, в частности, еще предстоит выяснить роль ЦИ в регуляции экспрессии UBE3A-AS-антисмыслового транскрипта.

Для выяснения конкретных молекулярных механизмов функционирования ЦИ были созданы модели экспериментальных трансгенных мух-дрозофил, у которых с помощью векторных конструкций в геном были введены фрагменты области ЦИ-СПВ (а именно, экзон 1 гена *SNRPN* и фланкирующие последовательности). В результате серии экспериментов выяснилось, что последовательность длиной 215 п.н. (от -203 до 12 нуклеотида относительно первого нуклеотида экзона 1 гена *SNRPN*) функционирует в геноме дрозодифилы как сайленсер, т.е. подавляет экспрессию генов, расположенных в окружающей области протяженностью нескольких т.п.н. В качестве контроля в геном дрозодифилы вводили фрагмент другого гена человека (*EHT1*), который не подвергается импринтингу, при этом сайленсерный эффект не наблюдался. В аналогичной работе были установлены сайленсерные свойства фрагмента мышинного гена *H19* протяженностью 1,2 т.п.н., который контролирует импринтинг в другом кластере генов. Таким образом, два независимых района, контролирующих переключение эпигенотипа в разных кластерах импринтированных генов у млекопитающих, в геноме дрозодифилы функционируют как сайленсеры.

В отличие от млекопитающих у дрозодифилы не описано явление геномного импринтинга и не обнаружено метилирование ДНК, однако, по-видимому, в основе аллельспецифической репрессии генов у млекопитающих могут лежать те же универсальные и высококонсервативные механизмы, благодаря которым функционируют сайленсеры в геноме дрозодифилы.

Установлено, что активность многих генов дрозодифилы зависит от структурной организации хроматина. Как известно, сайленсерные последовательности ДНК у дрозодифилы инициируют кооперативное связывание множества регуляторных белков, которые вызывают гетерохроматинизацию всей прилегающей хромосомной области. Возникшая в эмбриональной клетке гетерохроматиновая структура может стабильно наследоваться всеми последующими поколениями клеток и хранить память о функциональном статусе расположенных рядом генов.

Возможно в гаметогенезе у млекопитающих ЦИ, подобно сайленсерам дрозодифилы, инициирует сборку белковых комплексов, необходимых для изменения

упаковки хроматина. Поскольку эпигенетические модификации у млекопитающих сопряжены с метилированием ДНК, есть вероятность, что в составе этих комплексов присутствует фермент ДНК-метилтрансфераза 1. Согласно другому предположению, в результате изменения структуры хроматина повышается субстратная специфичность метилтрансферазы к ДНК, происходит метилирование и, таким образом, дополнительно фиксируются возникшие эпигенетические модификации. Предполагается, что переключение отцовского (неметилированного) эпигенотипа на материнский (метилированный) инициируется в районе ЦИ-СПВ (промоторная область и экзон 1 гена *SNRPN*), с которым сначала взаимодействует ВД-транскрипт, а затем происходит сборка многокомпонентного белкового комплекса, куда входит и ДНК-метилтрансфераза. После этого метилирование и гетерохроматинизация распространяются вдоль всего кластера импринтированных генов, составляющего 2 м.п.н. Так устанавливается материнский импринт в овогенезе. В сперматогенезе ВД-экзоны не транскрибируются, и сборки такого комплекса не происходит, а отцовский эпигенотип формируется автоматически в результате устранения предыдущего импринта. Высказывается мнение, что для устранения старого импринта область ЦИ-СПВ инициирует сборку другого комплекса в первичных половых клетках обоих полов. Очевидно, должен существовать механизм, не допускающий формирования импринт-иницирующего комплекса на активном отцовском аллеле вне клеток зародышевого пути.

Таким образом, ЦИ имеет две основные функции: 1) переключение в гаметогенезе женского импринта на мужской, или наоборот и 2) поддержание экспрессии или инактивации импринтированных генов критического района в течение жизни.

## Гены-кандидаты и их возможное участие в формировании фенотипических проявлений синдромов Прадера–Вилли и Ангельмана

### Гены-кандидаты синдрома Прадера–Вилли

СПВ сопровождается потерей функции генов критического района 15 (q11- q13), которые в норме экспрессируются только на хромосоме отцовского происхождения (*SNRPN*, *NDN*, *IPW*, *ZNF127*, *MAGEL2*), однако точковых мутаций, приводящих к СПВ, ни в одном из этих генов показано не было. На сегодняшний день имеются единичные сообщения о случаях сбалансированных транслокаций у пациентов с СПВ, при которых в разных сочетаниях нарушена функция отдельных генов на отцовской хромосоме. Однако до сих пор неизвестно, какой именно ген ответствен за все (или большинство) фенотипические проявления СПВ. Гены расположены в центромерной части критического района 15 (q11-q13) и занимают примерно половину его длины. Среди локусов, активных исключительно на отцовской хромосоме, на сегодняшний день известно четыре гена, кодирующих белки: *SNRPN* (small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N), *NDN* (necdin), *ZNF127* (zinc finger protein) и *MAGEL2* (клонирован в конце 1999 г., функция неизвестна), а также семь локусов, кодирующих нетранслируемые мРНК: *ZNF127AS*, *PAR5*, *PARSN*, *IPW*, *PWCR1*, *C15orf2* и *PAR1*.

**Ген *SNURF-SNRPN*.** Первоначально была показана моноаллельная экспрессия на отцовской хромосоме гена *SNRPN*, кодирующего полипептид N малого ядерного рибонуклеопротеина (мяРНП). Впоследствии было сделано предположение о возможной роли локуса *SNRPN* в регуляции экспрессии импринтированных генов критического района, а также более детально изучена структура, функция и молекулярная эволюция этого локуса.

Ген *SNRPN* состоит из 10 экзонов и имеет необычную для эукариот бицистронную структуру, т.е. его мРНК-транскрипт содержит две неперекрывающиеся рамки считывания для двух различных белковых продуктов. Один из них – белок *SNURF* (*SNRPN upstream reading frame*) – состоит из 71 аминокислоты и кодируется экзонами 1–3. Второй продукт этого гена – полипептид N (SmN) состоит из 240 аминокислот и кодируется экзонами 4–10 (рис. 46).

Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей каждого из этих белков у представителей разных групп млекопитающих выявил высокую консервативность в эволюции, что позволяет предполагать их участие в важнейших клеточных процессах. У пациентов с СПВ отсутствует экспрессия обоих продуктов гена *SNRPN*, поэтому каждый из них может быть вовлечен в патогенез этого синдрома.

Анализ экспрессии гена *SNURF-SNRPN* на уровне транскрипции методом Нозерн блот-гибридизации показал присутствие бицистронного *SNURF-SNRPN*-транскрипта во всех исследованных тканях человека (сердце, мозг, плацента, легкие, печень, скелетные мышцы, почка, поджелудочная железа). Помимо двойного *SNURF-SNRPN*-транскрипта, в тканях почки и мышц человека обнаружена укороченная мРНК, которая соответствует экзонам 1–3 гена *SNURF-SNRPN*. Это указывает на возможность автономной транскрипции *SNURF*-цистрона у человека благодаря наличию дополнительного 3b-экзона, содержащего сигнал полиаденилирования ААТAAA. В отличие от человека, у мыши *SNURF*-мРНК обнаруживается только в составе бицистронного *SNURF-SNRPN*-транскрипта. Функциональное назначение белка *SNURF* пока неизвестно.

Второй продукт гена *SNRPN* – полипептид N (SmN) является компонентом малых ядерных рибонуклеопротеинов (мяРНП). мяРНП представляют собой комплексы малых ядерных РНК (мяРНК) с белками. Они участвуют в построении сплайсосомы и обеспечивают механизмы вырезания интронных последовательностей из первичных транскриптов эукариотических генов.

Поскольку центр импринтинга перекрывает промоторную область и экзон 1 гена *SNURF-SNRPN*, и, следовательно, *SNURF*-цистрон является единственной белок-кодирующей последовательностью в составе центра импринтинга, возникает предположение о возможном участии *SNURF*-белка в регуляции экспрессии импринтированных генов на отцовской хромосоме.

Роль *SNURF*-цистрона в патогенезе СПВ подтверждается на примере двух пациентов с классической клинической картиной заболевания, имеющих сбалансированные транслокации с вовлечением отцовской хромосомы 15, при которых точка разрыва находится внутри цистрона *SNURF*, а экспрессия всех импринтированных локусов на отцовской хромосоме, кроме *SNURF*, сохранена. Кроме того, у экспериментальных мышей с нарушенной рамкой считывания *Sngrn*-полипептида наблюдали отсутствие каких-либо изменений фенотипа, характерных для мышинной модели СПВ. Однако были также описаны два других случая сба-

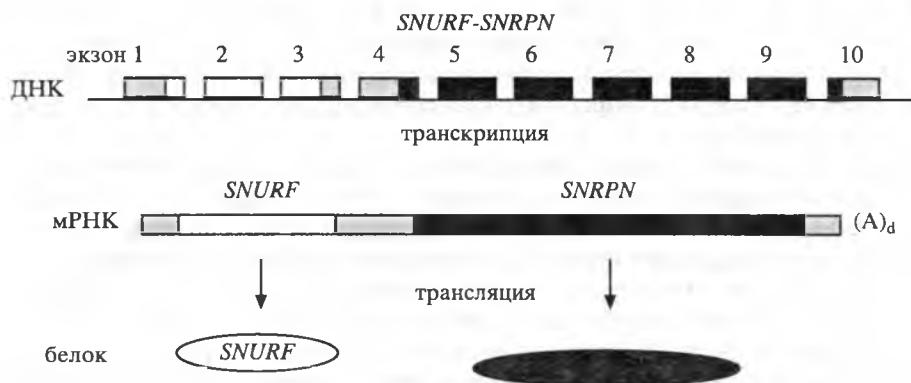


Рис. 46. Схема организации бицистронного локуса *SNURF-SNRPN*

лансированных транслокаций у пациентов с нетипичными проявлениями СПВ, когда точка разрыва не затрагивала *SNURF*-цистрон, а находилась дистальнее локуса *SNURF-SNRPN*. Следовательно, причиной развития СПВ нельзя считать нарушение экспрессии одного только *SNURF*-цистрона.

**Ген *ZNF127*.** В 1992 г. были обнаружены два других локуса с дифференциальным метилированием на отцовской и материнской хромосомах — *D15S63 (PW71)* и *D15S9 (ZNF127)*, которые расположены проксимальнее локуса *SNRPN*, в центромерной части критического района 15 (q11-q13). Впоследствии выяснилось, что локус *D15S9 (ZNF127)* кодирует два перекрывающихся гена *ZNF127* и *ZNF127AS*, причем оба транскрибируются только на отцовской хромосоме в противоположных направлениях. Белковый продукт обнаружен только для гена *ZNF127*, а *ZNF127AS (antisense)* кодирует антисмысловой по отношению к *ZNF127* транскрипт. Ген *ZNF127AS* занимает 5 т.п.н. геномной ДНК, содержит два экзона (X и Y) и единственный интрон протяженностью 2 т.п.н. Открытая рамка считывания для белка из 507 аминокислот, продукта гена *ZNF127*, обнаружена на антисмысловой цепи *ZNF127AS*-кДНК. В 5'-части гена *ZNF127* найден типичный для млекопитающих CpG-островок длиной 0,7 — 1,0 т.п.н. с содержанием C+G > 60%. Именно в этом CpG-островке выявлены различия метилирования на двух родительских хромосомах. Кроме того, в 5'-районе гена *ZNF127* обнаружены мотивы, распознаваемые некоторыми транскрипционными факторами: PEA3, SRE, SRY и HMG. Ген *ZNF127* не содержит интронов, но имеет 3'-нетранслируемую область. Вся кодирующая последовательность и CpG-островок этого гена соответствуют экзону Y гена *ZNF127AS*, а 3'-концевая часть расположена в интроне *ZNF127AS*. Таким образом, *D15S9* представляет собой комплексный локус для двух генов, транскрибирующихся на разных цепях ДНК.

Экспрессия гена *ZNF127* на уровне транскрипции показана методом Нозерн блотгибридизации во всех тканях взрослого человека, с максимальным уровнем *ZNF127*-мРНК в семенниках; максимальный уровень содержания *ZNF127AS*-транскрипта наблюдается в мозге и легких, а в большинстве других тканей взрослого человека транскрипция этого гена методом гибридизации не выявляется.

При изучении экспрессии генов *ZNF127* и *ZNF127AS* в фибробластах кожи методом ОТ-ПИП *ZNF127*-специфичный продукт обнаруживался только в фибробластах нормальных людей и пациентов с СА, но отсутствовал в случае СПВ. Следовательно, ген *ZNF127* в фибробластах кожи экспрессируется моноаллельно на отцовской хромосоме.

Продукт гена *ZNF127* — белок, состоящий из 507 аминокислот, который содержит нескольких мотивов типа «цинковых пальцев», принадлежащих к разным классам, что обеспечивает возможность специфических взаимодействий с большим количеством различных молекул и предполагает многообразие выполняемых функций.

Поскольку полное метилирование и импринтинг для гена *ZNF127* показаны только в мозге и гаметогенных тканях, высказывается мнение, что потеря экспрессии отцовского аллеля именно в этих органах критична при развитии таких симптомов СПВ как ожирение, гипогонадизм, психические расстройства, бесплодие. Однако делетирование гена *Znf127* у экспериментальных мышей не сопровождалось ожирением и бесплодием, поэтому окончательные выводы об участии гена *ZNF127* в патогенезе СПВ делать преждевременно.

**Ген *NDN*.** Локализован в критическом районе 15q11-15q13 с 3'-стороны от гена *ZNF127*. *NDN* не содержит интронов и кодирует белок, состоящий из 321 аминокислоты. В 5'-части гена, рядом с сайтом инициации транскрипции, обнаружена CpG-богатая промоторная область и установлено метилирование сайтов узнавания эндонуклеазы *EagI* в промоторной области на неактивном материнском аллеле. Транскрипционная инактивация материнской копии гена *NDN*, подобно другим импринтированным locusам *SNRPN* и *ZNF127*, обусловлена метилированием промоторной области.

Продукт гена *NDN* является супрессором роста нейронов и функционирует подобно ретинобластомному белку RB1, одному из наиболее изученных супрессоров опухолевого роста. Как и белок Rb, некдин связывает транскрипционный фактор E2F1 и задерживает переход G<sub>1</sub>-стадии клеточного цикла в стадию S. В эксперименте также показано, что некдин подавляет рост RB1-дефицитных SAOS-2 клеток остеосаркомы.

Поскольку среди всех изученных отделов мозга мышцы максимальное содержание некдиновой мРНК обнаружено в нейронах гипоталамуса, а клиническая картина СПВ у человека в значительной степени представлена симптомами дисфункции именно этого отдела мозга (ожирение, гипогонадизм), можно предполагать, что патогенез СПВ, по крайней мере частично, обусловлен нарушением дифференцировки нейронов гипоталамуса.

В связи с тем, что никаких точковых мутаций в генах-кандидатах не выявлено, а на модельных животных показано, что отсутствие любого из этих генов приводит к определенным аномалиям, СПВ можно охарактеризовать как синдром последовательности импринтированных генов, имеющих отцовскую экспрессию, а сам критический район — как комплекс импринтинга (contiguous gene imprinting complex).

## Гены-кандидаты синдрома Ангельмана

**Ген *UBE3A*.** Почти в 20% случаев СА выявляются мутации в основном генекандидате — *UBE3A*. Описаны также случаи инверсий с точкой разрыва внутри

этого гена при СА. Ген состоит из 16 экзонов и кодирует фермент Е6-АР убиквитинпротеинлигазу. Экспрессия этого белка показана во всех тканях человека, причем в ряде структур мозга *UBE3A* активен лишь на материнской хромосоме. У мышей моноаллельная экспрессия гена *Ube3a* была показана в клетках Пуркинье коры мозжечка, нейронах гиппокампа и обонятельной луковицы. В остальных отделах мозга и в других органах установлен биаллельный характер экспрессии. Дефицит материнской копии гена *UBE3A* в клетках Пуркинье может объяснить атаксию и тремор, наблюдаемые у пациентов с СА, а эпилептические припадки и невозможность обучения таких больных могут быть связаны с отсутствием экспрессии этого гена в нейронах гиппокампа.

Характерной особенностью генов с тканеспецифичным импринтингом является наличие нетранслируемых экзонов и нескольких промоторов. *UBE3A* транскрибируется с нескольких промоторов и имеет семь нетранслируемых экзонов в 5'-части гена.

Белок Е6-АР (продукт гена *UBE3A*) входит в состав мультиферментного комплекса, обеспечивающего присоединение к цитоплазматическим белкам молекулы небольшого белка убиквитина (состоящего из 76 аминокислот), после чего они становятся мишенями для деградации в протесомах. Мишенями для убиквитинзависимого протеолиза становятся большинство неправильно свернутых, денатурированных и других аномальных белков.

Помимо участия в процессе присоединения убиквитина белок Е6-АР служит транскрипционным коактиватором для рецепторов стероидных гормонов. Е6-АР функционирует одновременно как убиквитин-лигаза и как транскрипционный фактор. Обе эти активности независимы друг от друга, поскольку регуляция транскрипции опосредуется N-концевым доменом, а лигазная активность сопряжена с C-концевой частью белка.

Недавно (в 1999 г.) в 3'-нетранслируемом районе *UBE3A* обнаружен промоторный район нового гена, имеющего транскрипт длиной в 3,5 т.п.н. Этот транскрипт экспрессируется с материнского аллеля в мозге, но пока мутации в нем не обнаружены. Кроме того, в этом же районе найден антисмысловой транскрипт, включающий полностью смысловой транскрипт длиной в 3,5 т.п.н. и почти половину — *UBE3A*. Этот антисмысловой транскрипт экспрессируется в мозге преимущественно с отцовского аллеля, но делать заключение о его функции в генезе СА пока преждевременно.

В результате прямого секвенирования образцов ДНК 55 пациентов с клиническим диагнозом СА, у которых наблюдался нормальный статус метилирования локусов критического района, мутации были обнаружены в 75% (6 из 8) семейных случаев и в 23% (11 из 47) спорадических случаев заболевания. В другом исследовании методом однонитового конформационного полиморфизма (SSCP) были обнаружены мутации в 80% семейных и 14% спорадических случаев СА. Во всех информативных семьях, где были обнаружены мутации, фенотип СА наблюдался только в случае наследования мутации от матери. Мутации гена *UBE3A* на отцовской хромосоме фенотипически не проявляются.

Из 29 различных мутаций гена *UBE3A* оказалось: 17 — со сдвигом рамки считывания, 5 — нонсенс, 3 — миссенс, один случай делеции аминокислотного остатка, одна инсерция аминокислотного остатка, одна мутация в сайте сплайсинга и 1 мутация в стоп-кодоне. Таким образом, преобладали мутации со сдвигом



рамки считывания и нонсенс мутации. Миссенс мутации, по-видимому, существенно не нарушают функцию белкового продукта, и фенотип у таких пациентов отличается от классической клиники СА. Отсутствие выявленного молекулярного дефекта у части пациентов может объясняться неточностью клинического диагноза в связи с вариабельностью фенотипических проявлений и несовершенством диагностических критериев данного заболевания.

**Ген *ATP10C*.** Недавно дистальнее в 200 т.п.н. гена *UBE3A* был обнаружен новый ген *ATP10C*, кодирующий аминокислотный фосфолипид-транспортирующую АТФазу. Ген содержит 21 экзон и кодирует белок, состоящий из 1499 аминокислотных остатков. Установлено, что ген экспрессируется преимущественно с материнского аллеля в фибробластах и различных структурах мозга. Его функцией является поддержание контактов между клеточными мембранами и передача сигналов в ЦНС. Вполне вероятно, что отсутствие экспрессии гена при СА в мозге может приводить к более тяжелой симптоматике, связанной с тяжелым аутизмом у больных.

**Ген *GABRB3*.** Патогенез эпилептических припадков при СА связывают с кластером ГАМК-А-рецепторных генов, которые располагаются между геном *UBE3A* и локусом *P* и поэтому попадают в область наиболее частых делеций в 4 м.п.н. Один из этих генов, *GABRB3*, кодирует  $\beta_3$ -субъединицу ГАМК-рецептора. У экспериментальных мышей, несущих гомозиготную делецию гена *Gabrb3*, наблюдаются нарушения памяти, неспособность к обучению, судорожные припадки и моторные нарушения, сходные с симптомами СА, а гетерозиготные по этой делеции животные имеют менее выраженные неврологические расстройства. Следовательно, клиническая симптоматика СА в случае протяженной делеции, по крайней мере частично, может быть обусловлена гаплонедостаточностью гена *GABRB3*.

**ЛОКУС *P*.** В область наиболее частых делеций при СА и СПВ попадает также локус *P*, который функционирует биаллельно и располагается в дистальной части критического района. Локус *P* отвечает за пигментацию кожи и радужной оболочки глаза. Потеря обоих аллелей этого гена у человека и мыши приводит к альбинизму, а у гетерозигот по мутациям в гене *P* наблюдается незначительное снижение пигментации. Действительно, гипопигментация кожи в фенотипе СПВ и СА наблюдается только в случае протяженных (4 м.п.н.) делеций критического района, но отсутствует у пациентов с ОРД, мутациями центра импринтинга и точковыми мутациями в гене *UBE3A*.

## 5.6. ДНК-ДИАГНОСТИКА СИНДРОМОВ ПРАДЕРА-ВИЛЛИ И АНГЕЛЬМАНА

### Анализ аллельного метилирования локусов хромосомного района 15 (q11-q13)

Поскольку непосредственной причиной СПВ и СА становится потеря функции генов критического района 15 (q11-q13) на отцовской и материнской хромо-

сомах соответственно, а экспрессия генов в этой хромосомной области строго соотносится с характером метилирования ДНК, молекулярно-диагностический тест для СПВ и СА может быть основан на том, что метилирование некоторых локусов критического района существенно различается на отцовской и материнской хромосомах.

Отцовское гипометилирование и материнское гиперметилирование локусов *D15S63 (PW71)*, *D15S9 (ZNF127)* и промоторной области гена *SNRPN* согласуются с отцовской аллельспецифичной активностью большинства импринтированных генов критического района. Анализ аллельного метилирования любого из этих локусов может быть положен в основу диагностического теста для СПВ и СА. При СПВ, независимо от причины возникновения (отцовская делеция, материнская ОРД или мутация ЦИ), присутствуют только метилированные аллели перечисленных локусов, а случаи СА (кроме точковых мутаций в гене-кандидате *UBE3A*) характеризуются наличием только неметилированных аллелей этих же локусов.

Существуют два методических подхода к исследованию метилирования ДНК.

1. *Использование метилчувствительных рестриктаз.* Метилчувствительные рестриктазы расщепляют ДНК только в том случае, если сайт узнавания содержит неметилированный остаток цитозина.

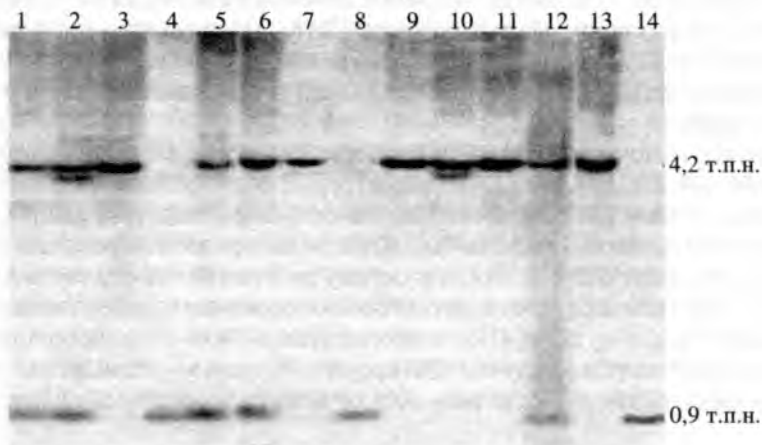
Промоторная область гена *SNRPN* на отцовской хромосоме характеризуется отсутствием метилирования, поэтому при обработке метилчувствительными рестриктазами происходит гидролиз отцовской ДНК по неметилированным сайтам рестрикции. Остатки цитозина на материнской хромосоме в сайтах рестрикции метилируются, поэтому материнский аллель устойчив к гидролизу метилчувствительными рестриктазами.

Геномную ДНК обрабатывают одновременно метилчувствительной рестриктазой и другим редкощепящим ферментом, проводят электрофорез и переносят полученные фрагменты ДНК на фильтр, после чего гибридизуют с зондом на один из локусов дифференциального метилирования.

Отцовский аллель после гидролиза метилчувствительной рестриктазой имеет меньшую длину по сравнению с материнским. У нормальных индивидов наблюдаются два гибридизационных сигнала, соответствующие двум родительским аллелям (рис. 47). Наличие у пациента только тяжелого (метилированного материнского) или только легкого (неметилированного отцовского) аллеля позволяет сделать вывод о структурном или функциональном нарушении участка 5 (q11-q13), приводящем к СПВ или СА, соответственно. В лабораторной практике наиболее распространено применение зондов *PW71B* (на локус *D15S63*) и «экзон  $\alpha$ » (на промоторную область гена *SNRPN*).

Существенными недостатками метода блот-гибридизации по Саузерну являются: необходимость применения дорогостоящих метилчувствительных рестриктаз и радиоактивно меченных зондов; длительность и трудоемкость выполнения эксперимента; большие количества ДНК пациента, необходимые для анализа. Кроме того, неполная рестрикция геномной ДНК (особенно характерна для рестриктазы *NotI*, используемой при анализе локуса *SNRPN*) становится причиной ложно-положительных (при СПВ) и ложно-отрицательных (при СА) результатов.

2. *Метилспецифическая МЦР (МС-ПЦР) модифицированной ДНК* (См. также в гл. 7). В последнее время получил распространение новый метод анализа метили-



**Рис. 47.** Анализ аллельного метилирования промоторной области гена *SNRPN* методом блот-гибридизации с использованием рестриктаз *NorI*, *XbaI* и ДНК-зонда «экзон α»

Фрагмент длиной 4,2 т.п.н. соответствует метилированному материнскому, а 0,9 т.п.н – неметилированному отцовскому аллелю. Дорожки 1,2,5,6,12 – норма; 3,7,9,10,11,10 – пациенты с СПВ; 4,8,14 – пациенты с СА

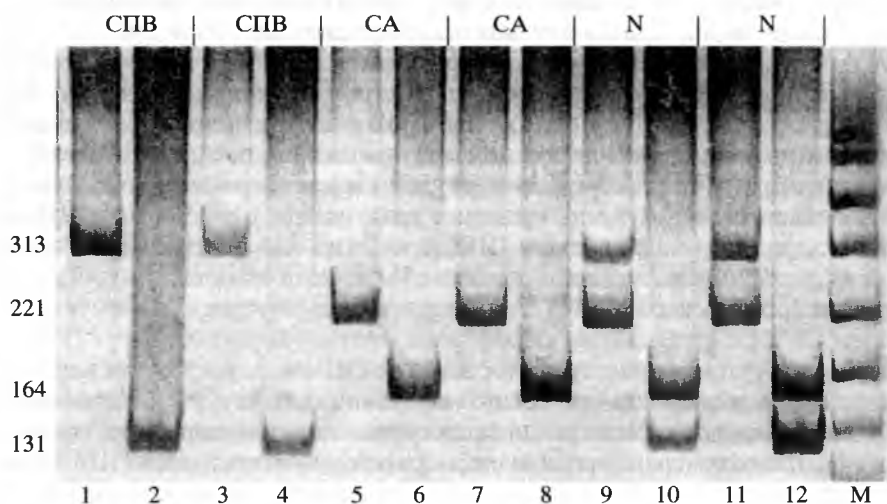
рования ДНК, который основан на модификации геномной ДНК бисульфитом натрия. В ходе такой обработки происходит химическое превращение неметилированных остатков цитозина в урацил, тогда как 5-метилцитозин остается в неизменном виде. По изменению нуклеотидного состава в результате обработки бисульфитом натрия можно судить о состоянии метилирования каждого цитозинового остатка исследуемой ДНК.

После обработки геномной ДНК бисульфитом натрия материнская и отцовская копии гена *SNRPN* в сайтах с различным метилированием приобретают различия в нуклеотидном составе. Это позволяет так подобрать праймеры, чтобы их отжиг и длина продукта амплификации зависели от метилирования указанного локуса на исследуемой ДНК. При амплификации ДНК здоровых людей образуются фрагменты, соответствующие двум родительским аллелям (рис. 48). При СПВ образуется продукт ПЦР только той длины, которая соответствует метилированному (материнскому) аллелю, а в случае СА присутствует только неметилированный отцовский аллель, поэтому выявляется фрагмент другой длины.

Преимущества метилспецифической ПЦР по сравнению с применением метилчувствительных рестриктаз заключаются в: а) отсутствии применения радиоактивно меченных ДНК-зондов; б) возможности анализа малых количеств ДНК; в) высокой чувствительности и специфичности; г) простоте и скорости выполнения диагностики.

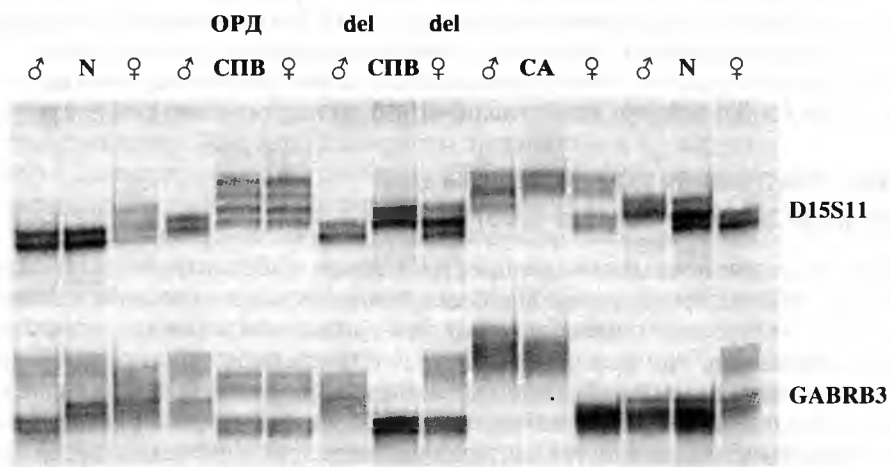
## Анализ микросателлитного полиморфизма локусов хромосомного района 15 (q11-q13)

Анализ аллельного метилирования позволяет подтвердить или исключить диагноз СА и СПВ у большинства (~90%) пациентов, но не дает представления



**Рис. 48.** Анализ аллельного метилирования промоторной области гена *SNRPN* методом метилспецифической ПЦР

В дорожках с четными номерами нанесены продукты ПЦР, полученные в реакции с двумя парами праймеров – Met и Upmet. В дорожках с нечетными номерами – продукты амплификации с тремя праймерами (Mat, Pat, Com). Длины фрагментов ДНК указаны в парах нуклеотидов (п.н.). М – маркер длины фрагментов ДНК *puc19/HpaII*. СПВ – синдром Прадера-Вилли, СА – синдром Ангельмана, N – норма



**Рис. 49.** Анализ микросателлитного полиморфизма локусов *D15S11* и *GABRB3* у пациентов с СПВ и СА

СПВ – синдром Прадера-Вилли, СА – синдром Ангельмана; ♂ – отец, ♀ – мать; del – делеция, ORD – однородительская дисомия

об истинной причине заболевания. Поэтому с целью выявления делеций и одно-родительских дисомий, применяют анализ микросателлитных локусов *D15S11*, *D15S113* и *GABRB3*, характеризующихся большим количеством аллелей и гетерозиготностью более 80%. Анализ проводится в денатурирующем ПААГ (рис. 49).

При подтвержденном диагнозе СА или СПВ в случае отсутствия делеций и ОРД с помощью анализа метилирования можно выявлять предполагаемые делеции центра импринтинга, а если результат анализа метилирования тоже отрицательный, существует вероятность мутации в генах-кандидатах. Делеции ЦИ выявляют методом блот-гибридизации ДНК с зондами на область ЦИ. Точковые мутации в гене *UBE3A* могут быть выявлены SSCP или с помощью анализа подвижности гетеродуплексов в ПААГ, а также прямым секвенированием экзонов этого гена.

Выявление мутаций в гене *UBE3A* и делеций ЦИ имеет исключительно важное значение для медико-генетического консультирования семьи и планирования рождения здорового потомства, поскольку именно эти генетические причины обуславливают максимальный риск повторного рождения ребенка с СПВ или СА.

## 5.7. СИНДРОМ ВИДЕМАННА–БЕКВИТА И ВТОРАЯ МОДЕЛЬ ИМПРИНТИНГА

В плане импринтинга не менее изучаемым является терминальный район короткого плеча хромосомы 11. Структурные и функциональные аномалии этого критического района обнаруживаются при хорошо известном синдроме Видеманна–Беквита, при нефробластоме и других опухолях детского возраста. Участок ДНК, составляющий около 1 м.п.н., содержит гены, участвующие в импринтинге, и регуляторные элементы, которые контролируют экспрессию этих генов, но несколько по-другому, чем в районе 15q11.2, что позволяет говорить об иной модели импринтинга. Несмотря на обилие экспериментальных данных, общие механизмы функциональной регуляции этого импринтированного района в норме и при патологии еще далеко не поняты.

### Клинико-генетическая характеристика синдрома Видеманна–Беквита (СВБ)

СВБ является достаточно распространенным заболеванием с частотой 1:10 000–12 000 новорожденных. Наиболее важными для диагностики являются следующие клинические признаки: пупочная грыжа, макроглоссия, гигантизм (средняя масса тела при рождении – 3900 г). Отмечаются гипоплазия средней трети лица, гемангиомы на лбу, гипоплазия верхней челюсти, прогнатизм, вертикальные складки или бороздки на мочках и небольшие полулунные вдавления на задней поверхности завитков ушных раковин, пигментные невусы на коже лица, затылка, долихоцефалия. Характерна висцеромегалия, выражающаяся в увеличении печени, почек, селезенки, поджелудочной железы, надпочечников, гонад и предстательной железы. Предполагается, что клеточная гиперплазия и гипертрофия является следствием того, что часть эмбриональных клеток продолжают секретировать паракринные и/или эндокринные факторы роста в пренатальной

и постнатальной фазах онтогенеза. У большинства новорожденных отмечается гипогликемия, что может приводить к неврологическим нарушениям. Умственная отсталость выявлена в 15% случаев. Важным проявлением синдрома является повышенная предрасположенность к возникновению опухолей. В одном из клинических обзоров 1978 г. были обобщены данные о 33 случаях различных опухолей при СВБ. Некоторые пациенты имели по две различные формы новообразований. Наиболее часты нефробластомы — 18 случаев, у 7 пациентов выявлен рак надпочечников, у 3 — гепатобластомы. Другие формы опухолей представлены единичными случаями. В самом крупном исследовании, охватившем 388 детей с СВБ, у 29 (7,5%) было обнаружено 32 опухоли, среди которых нефробластома составила 59%, карцинома надпочечников — 15%, была выявлена гепатобластома (2) и рабдомиосаркома. Гемигипертрофия наблюдалась в 12,5% случаев, а у больных с новообразованиями — почти в 50%.

Клинические проявления синдрома достаточно разнообразны и классическое сочетание трех основных диагностических признаков не обязательно. Наследование СВБ было достаточно неясным. Предполагались аутосомно-рецессивный, аутосомно-доминантный типы наследования, мультифакториальная природа заболевания, связь синдрома с мутациями отсроченного типа. Вместе с тем каждое из этих предположений было в состоянии объяснить лишь некоторую часть наблюдений. В настоящее время общепринято, что синдром наследуется аутосомно-доминантно с неполной пенетрантностью и вариабельной экспрессивностью, причем значительную компоненту в наследование синдрома вносит импринтинг. Семейное накопление клинических признаков отмечено в 15% случаев СВБ.

Интерес к цитогенетическим исследованиям синдрома Видеманна—Беквита был вызван тем, что у нескольких больных была выявлена частичная трисомия дистальной части короткого плеча хромосомы 11 как в результате аномальной сегрегации в мейозе отцовских структурных перестроек хромосом, так и в результате спорадических дупликаций критического района. Необходимо отметить, что структурные изменения происходили в кариотипе отцов и, следовательно, пробанд наследовал двойную дозу генов, расположенных в участке 11p15.5 отцовского происхождения. Это явилось первым аргументом в пользу импринтинга как одного из механизмов возникновения СВБ. Около 20% спорадических случаев заболевания показывают наличие отцовской ОРД. Отцовская ОРД является результатом постзиготической митотической рекомбинации с высокой долей мозаицизма. Материнская дисомия по этому участку не описана либо вследствие нежизнеспособности плодов, либо отсутствия фенотипических проявлений. В 1984 г. была описана первая сбалансированная транслокация хромосом 11 и 22 у пациента с СВБ, унаследованная от матери. Описано около 40 случаев сбалансированных перестроек, унаследованных от матери, причем все точки разрыва в хромосоме 11 были локализованы в критическом районе. Молекулярный анализ точек разрыва при этих сбалансированных перестройках показал, что существуют три основных района. Наиболее часто повреждается район локализации гена *KvLQT1* — названный первым хромосомным районом СВБ (СВБ-ХР1). Два других района — СВБ-ХР2 и СВБ-ХР3 локализованы ближе к центромере на 5 и 7 м.п.н., соответственно. В общей сложности структурные аномалии хромосомы 11 выявляются у 2 % больных.

## Молекулярная организация импринтированного района 11p15.5 и гены, вовлеченные в формирование фенотипических признаков синдрома Видеманна–Беквита

Организация хромосомного района 11p15.5 напоминает организацию участка 15q11.2 и содержит кластер импринтированных генов, перемежающихся неимпринтированными (рис. 50).

Со стороны центромеры импринтированный район ограничен геном *NAP2*, который экспрессируется биаллельно в эмбриональных и зрелых тканях. Первым импринтированным геном кластера является *IPL/TSSC3*. Ген содержит два экзона, разделенных маленьким интроном, экспрессируется преимущественно с материнского аллеля и ограничено — с отцовского. Наиболее активная работа гена обнаружена в плаценте, в зрелых клетках печени, легких, почек и поджелудочной железы. В клетках взрослого мозга и лимфоцитах крови ген экспрессируется биаллельно. Его роль как гена-супрессора предположили в результате обнаружения инактивации или потери материнского аллеля в различных опухолях головного мозга.

Импринтированный ген *IMPT1/TSSC5* кодирует белок полиспецифичного мембранного переносчика и относится к семейству генов, ответственных за полиспецифичный транспорт и множественную лекарственную устойчивость. Он содержит 11 экзонов, занимает 23 т.п.н. геномной ДНК и интенсивно экспрессируется с материнского аллеля в печени, почках и сердце. В ряде опухолей, таких как рак молочной железы, легкого, рабдомиосаркома и нефробластома, обнаружены точковые мутации и потеря материнской копии. С антисмысловой цепи транскрибируется ген *IMPT1-AS*, первый экзон которого соответствует 31 нуклеотиду второго экзона *IMPT1*. Он имеет множественные сайты инициации транскрипции, но обнаружено всего два транскрипта. Вероятно, этот ген не транслируется и, возможно, осуществляет регуляцию смыслового гена. На сегодняшний момент не установлено, является ли он импринтированным.

Ген *CDKN1C* кодирует ингибитор циклин-зависимой киназы, относящейся к *CIP*-семейству регуляторов клеточного цикла. Гиперэкспрессия гена, известного еще и как *p57KIP2*, может останавливать клеточный цикл на границе фазы  $G_1$ . Поскольку это единственный ген, в котором обнаруживаются мутации у некоторых больных с СВБ, он является наиболее реальным геном-кандидатом, ответственным за развитие этого синдрома. Мыши, мутантные по этому гену, имеют дефекты передней брюшной стенки, медуллярную дисплазию почек, цитомегалию надпочечников, хотя другие признаки СВБ отсутствуют. Поскольку ген является негативным регулятором клеточного цикла и экспрессируется с материнской хромосомы, ПГ именно материнского аллеля иногда выявляют в опухолях детского возраста, таких как нефробластома, рабдомиосаркома, карцинома надпочечников и др.

Ген *KvLQT1* кодирует заслонку калиевых каналов, экспрессируется биаллельно только в сердечной мышце, а выявленные точковые мутации сопровождаются либо доминантно наследуемым дефектом проводимости сердечной мышцы, выражающейся в удлинённом QT-интервале и желудочковой аритмии, называемым LQT-синдромом, либо аутосомно-рецессивным синдромом Джервела–Ланге–Нильсе-

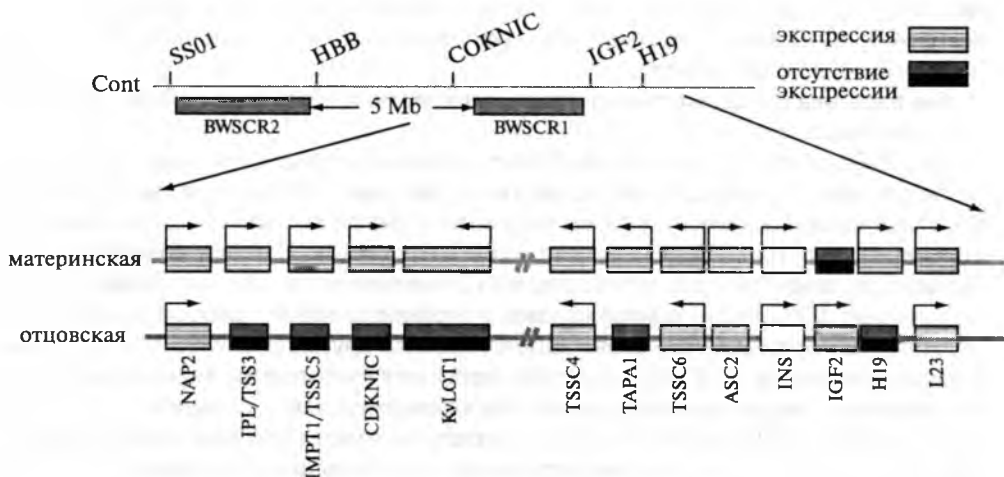


Рис. 50. Молекулярная организация хромосомного района 11p15.5

на, при котором обнаруживается глухота и аналогичные аномалии проводимости. Ген содержит 19 экзонов, занимает более 400 т.п.н. геномной ДНК, экспрессируется практически во всех тканях с материнского аллеля и почти не экспрессируется в мозге и скелетных мышцах. Известно четыре изоформы транскриптов этого гена. Первая форма транскрибируется только с материнского аллеля и выявлена в большинстве тканей, вторая — транскрибируется биаллельно в сердечной мышце, а третья и четвертая формы не транслируются. Роль этого гена в генезе СВБ на сегодняшний день неясна, но поскольку он кодирует множество нетранслируемых транскриптов, нельзя исключить его роль в поддержании импринтинга. В интроне 10 гена *KvLQT1* обнаружен новый ген *LIT1* (LQT intronic transcript 1), транскрибирующийся с антисмысловой цепи, но только с отцовской хромосомы. Индуцированные мутации или делеции, повреждающие CpG-островок *Lit1*, у мышей приводили к экспрессии *Kvlqt* и *p57* с отцовской хромосомы. В значительном количестве случаев СВБ установлена биаллельная экспрессия гена *LIT1*, тогда как в нефробластомах выявляется только моноаллельная экспрессия гена.

Дистальней описанного выше гена расположен недавно (2000 г.) клонированный ген *MTR1*, который содержит 24 экзона, транскрибируется только с отцовской хромосомы, а его транскрипт составляет 4,5 т.о. На сегодняшний момент функция гена еще не установлена.

Два гена, *TSSC4* и *TSSC6*, не импринтированы, не имеют гомологии с известными генами и кодируют белки с предполагаемой опухолеподавляющей функцией, так как ингибируют рост клеточных линий рабдомиосаркомы. Между этими двумя генами обнаружен ген *TAPA1* (*CD81*), который кодирует интегральный мембранный белок, выявленный в различных типах клеток. Ген экспрессируется только с материнской хромосомы и участвует в ранних этапах развития Т-лимфоцитов.

Дистальнее также расположен ген *HASH2*, экспрессирующийся с материнского аллеля и являющийся транскрипционным фактором, продукт которого содер-



жит мотив спираль—петля—спираль. Белок участвует в развитии трофобластодермы, а эмбрионы мыши, несущие мутации или делеции этого гена, погибают на 10-й день после оплодотворения.

**Ген инсулина (*INS*)** импринтирован у мыши, но имеет биаллельную экспрессию у человека.

Ген *IGF2* (инсулиноподобный фактор роста) кодирует фетальный ростовой фактор, и его аномальная экспрессия может вызывать органомегалию при СВБ. Он является митогеном практически для всех типов клеток, но специфически модулирует рост и дифференциацию мышечных клеток. И в эмбриональных, и в зрелых тканях ген экспрессируется только с отцовской хромосомы. Биаллельную экспрессию *IGF2* часто обнаруживают в нефробластомах, рабдомиосаркомах, карциномах кортикального слоя надпочечников и других эмбриональных опухолях, характерных для СВБ. Его гиперэкспрессия у трансгенных мышей вызывает увеличение размеров тела, макроглоссию, органомегалию и опухоли.

**Гены *IGF2* и *H19*** тесно (90 т.п.н.) сцеплены и имеют противоположный импринтинг. Аномалии их экспрессии достаточно часто обнаруживают при СВБ. *H19* экспрессируется с материнской хромосомы и кодирует нетранслируемую РНК с неизвестной функцией. Мыши с делецией гена *H19* полностью имитируют эпигенетическое нарушение регуляции экспрессии гена *IGF2* при СВБ, что выражается в увеличении размеров тела и экзомфалосе. Анализ андрогенетического пузырьного заноса показал, что отцовский аллель *H19* полностью импринтирован. Исследование метилирования гена в течение эмбриогенеза мыши показало, что оба аллеля не метилированы в эмбриональных герминальных клетках. Метилирование отцовского аллеля происходит в середине плодного периода. Отсутствие метилирования в период развития мужских половых клеток заставляет предполагать наличие других эпигенетических механизмов, поддерживающих отцовскую метку.

В 40 т.п.н. от гена *H19* клонирован ген *L23*, кодирующий рибосомоподобный белок, который экспрессируется биаллельно и в эмбриональных, и в зрелых тканях. Этот ген ограничивает дистальную часть импринтированного района.

В районе СВБ-ХР2, повреждаемом точками разрыва сбалансированных перестроек материнского происхождения при СВБ, клонированы два гена, несущих мотивы «цинковых пальцев» — *ZNF214* и *ZNF215*. Последний из них имеет пять различных транскриптов, антисмысловой транскрипт и экспрессируется в норме только с материнского аллеля. Роль в генезе СВБ пока не изучена. Структурная организация СВБ-ХР3 еще не исследована.

## Молекулярная патология, приводящая к синдрому Видеманна–Беквита

При СВБ часто обнаруживают как структурную, так и функциональную патологию. Структурные изменения короткого плеча хромосомы 11 при СВБ составляют около 2% и представлены либо спорадическими дупликациями и частичной трисомией отцовской хромосомы, либо унаследованными от матери сбалансированными транслокациями или инверсиями.

Среди семейных случаев СВБ почти в 40% выявляют мутации гена *CDKN1C*, а в спорадических — не более 5%. Поэтому ген является наиболее реальным кандидатом и суммарную частоту мутаций в нем можно оценить как 10–15%.

Ген *IGF2*, экспрессирующийся с отцовской хромосомы, рассматривается как другой ген-кандидат для СВБ. Мутации в нем не обнаружили, но у больных с СВБ была выявлена биаллельная экспрессия гена, т.е. ген начинает либо экспрессироваться с материнской хромосомы, либо биаллельная экспрессия является результатом отцовской ОРД. Такое явление называется *потерей импринтинга* (ПИ) и обнаруживается в 20% у больных с СВБ. В случае отцовской ОРД биаллельная экспрессия *IGF2* сопровождается биаллельным отсутствием экспрессии гена *H19*. В ряде случаев аномальная экспрессия этих двух генов происходит не в результате ОРД, что заставляет предполагать наличие некоего регуляторного района, который может соответствовать ЦИ. Его патология на материнской хромосоме вызывает активацию одного гена и инактивацию другого. В 5'-районе *H19* расположен CpG-обогащенный район, метилированный на отцовской хромосоме, протяженностью более 700 п.н. Делеция или метилирование этого района приводит к потере импринтинга гена *IGF2* на материнской хромосоме и его биаллельной экспрессии. Первый центр импринтинга при СВБ (СВБ-ЦИ1) контролирует моноаллельную экспрессию двух противоположно импринтированных генов, что заставляет предполагать наличие в нем двух функционально различных регуляторных элементов.

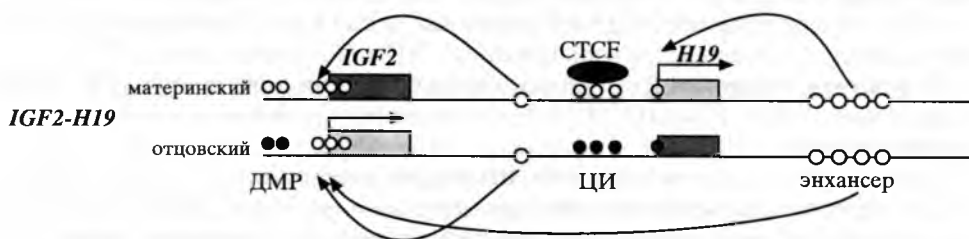
У одного из больных СВБ, имеющего унаследованную сбалансированную инверсию хромосомы 11 в районе 11p с точкой разрыва в СВБ-ХР1, была обнаружена ПИ *IGF2* при нормальном эпигенотипе *H19*. Основная масса спорадических больных без хромосомной патологии имеет именно такое состояние этих двух генов. Это заставило предполагать наличие еще одного регуляторного центра (СВБ-ЦИ2), патология которого приводит к СВБ. СВБ-ЦИ2, представленный районом дифференциального метилирования (РДМ), был обнаружен в интроне 10 гена *KvLQT* перед геном *LIT1*, который транскрибируется с антисмысловой цепи только отцовского аллеля. Было показано, что этот район метилирован в ооцитах и не метилирован в спермиях, и такие же различия выявлены в зиготе и эмбриональных стволовых клетках, т.е. РДМ действительно имеет признаки СВБ-ЦИ2. Больные, у которых был установлен нормальный паттерн метилирования гена *H19*, в то же время имели потерю метилирования СВБ-ЦИ2 на материнском аллеле и экспрессию *LIT1*. Оказалось, что в большинстве случаев СВБ (до 58%) обнаруживается его биаллельная экспрессия, т.е. происходит ПИ, аналогичная *IGF2*. Было показано, что ПИ *IGF2* и *LIT1* при СВБ может происходить и раздельно, и сочетанно. Молекулярный анализ группы больных с СВБ показал, что в 20% обнаруживается ОРД и ПИ генов *IGF2* и *LIT1*, изолированная ПИ *IGF2* наблюдалась у 7% больных, а изолированная ПИ *LIT1* установлена в 55% случаев. При этом в последней группе больных не было обнаружено опухолей, тогда как больные с ПИ *IGF2* или ОРД в 33% случаев имели характерные для синдрома новообразования.

Таким образом, критический для СВБ импринтированный район хромосомы 11p15.5 содержит, по крайней мере, два центра импринтинга, находящихся на расстоянии в 600 т.п.н., нарушения функционирования которых могут приводить к заболеванию, т.е. эпигенетическая патология может составлять 70–80%. Суммарно, структурную и функциональную патологию при СВБ можно определить в 85–95% случаев.

## Тонкая структурно-функциональная организация района, содержащего гены *H19* и *IGF2*

Каким образом осуществляется координированная регуляция генов, расположенных в импринтированном районе, в норме и при патологии, на сегодняшний момент неизвестно, хотя различных, иногда взаимоисключающих, гипотез высказано достаточно. Это связано с тем, что структурно-функциональная организация этого критического района исследована еще не полностью. Тем не менее результаты структурно-функционального анализа этого района в последние два года и созданные линии мышей с индуцированными мутациями регуляторных районов позволили представить уточненную, но не окончательную, организацию локуса, содержащего гены *H19* и *IGF2* (рис. 51).

Гены *H19* и *IGF2* тесно сцеплены, противоположно импринтированы и их экспрессия регулируется общим энхансером, расположенным в 3'-области *H19*. Недавно в нескольких т.п.н. от 5'-области *H19* был обнаружен дифференциально метилированный протяженный район, который, видимо, является ключевым — СВБ-ЦИ1 — и необходим для импринтинга обоих генов. В метилированном состоянии на отцовской хромосоме он необходим для выключения *H19*, а на материнской хромосоме, будучи неметилированным, он участвует в выключении *IGF2*. Этот СВБ-ЦИ1 содержит последовательность в 45 п.н., представленных гуанином и цитозином, которая соответствует В-повторам и имеет гомологию с гиперчувствительными к ДНКазе районами. 3'-область района СВБ-ЦИ1 работает как сайленсер в геноме трансгенной *Drosophila*, блокируя транскрипцию рядом расположенных генов. Делеции этого участка на отцовской хромосоме приводят к активации *H19*, а делеции на материнской хромосоме не влияют на экспрессию этого гена. На материнской хромосоме неметилированный СВБ-ЦИ1 содержит гиперчувствительные к ДНКазе сайты, что свидетельствует о его активности, и сайты связывания белка CTCF, который, как стало известно в последнее время, может блокировать энхансеры. СВБ-ЦИ1 содержит элемент, напоминающий своими свойствами инсулятор, блокирующий или модулирующий доступ энхансера к промоторным районам генов. В активном состоянии СВБ-ЦИ1 эффективно блокирует взаимодействие энхансера с промоторным районом *IGF2*, который не может экспрессироваться на материнской хромосоме. На отцовской хромосоме СВБ-ЦИ1 метилирован, не имеет возможности связывать CTCF и не препят-



**Рис. 51.** Схема функционирования противоположно импринтированных генов *IGF2* и *H19*

ствуется возможности активации *IGF2* энхансером. В то же время, будучи метилированным, он вызывает инактивацию *H19* на отцовской хромосоме. CTCF является первым обнаруженным белком, который необходим для нормального функционирования эпигенетической метки. Таким образом, СВБ-ЦИ1 действует как пограничный элемент или инсулятор, блокирующий взаимодействие *IGF2* с энхансером, расположенным в 3'-области гена *H19*. Блокирующее действие полностью теряется, если район метилирован.

В 5'-районе *IGF2* обнаружен еще один РДМ, метилированный на отцовской хромосоме. РДМ обладает свойствами сайленсера и в активном состоянии блокирует экспрессию *IGF2* на материнской хромосоме в тканях мезодермального происхождения, но не в мышцах. Если делеция этого района унаследована от матери, то блокирующий *IGF2* эффект отсутствует — ген экспрессируется биаллельно (ПИ). Если делеция имеет отцовское происхождение, то транскрипция отцовского аллеля *IGF2* не нарушена. В 3'-области *IGF2* выявлен еще один регуляторный элемент, имеющий свойства сайленсера, но не имеющий дифференциального метилирования. У мышей, имеющих делецию сайленсера 2 на материнской хромосоме, происходит биаллельная экспрессия *IGF2* преимущественно в мышцах, особенно в языке, что приводит к макроглоссии. Делеция сайленсера 2 на отцовской хромосоме не изменяет уровень экспрессии *IGF2*.

Предполагается, что второй кластер импринтированных генов, содержащий *CDKN1C*, *KvLQT1* и *LIT1*, должен функционировать аналогично. Пока явных регуляторных элементов, аналогичных энхансерам и сайленсерам не выявлено, за исключением РДМ, расположенного перед *LIT1* и функционирующего как СВБ-ЦИ2. По-видимому, СВБ-ЦИ2 является более сильным по сравнению с СВБ-ЦИ1, так как его нарушения в результате сбалансированных перестроек приводят к ПИ и *LIT1*, и *IGF2*, в то время как при функциональных нарушениях СВБ-ЦИ1 происходит ПИ только *IGF2*. Имеются ли еще какие-нибудь элементы, осуществляющие регуляцию импринтированных генов и взаимодействие двух ЦИ в критическом районе, покажут дальнейшие исследования.

## 5.8. МЕХАНИЗМЫ ГЕНОМНОГО ИМПРИНТИНГА

Согласно современным представлениям, в основе геномного импринтинга у млекопитающих лежат специфические структурно-молекулярные изменения некоторых хромосомных участков, происходящие во время формирования мужских и женских половых клеток, которые приводят к стойким различиям экспрессии отцовских и материнских генов у потомства. Предполагается, что импринтинг изменяет структуру гена так, что регуляторные факторы, действие которых проявляется в клетке позднее, распознают импринтированные (меченые, видоизмененные каким-то образом) материнские или отцовские аллели и избирательно их инактивируют. Отсутствие действия этих факторов, так же как и нарушение модификации генов, может привести к потере их нормальной моноаллельной экспрессии.

Совокупность модификаций, которые по-разному маркируют родительские аллели и обеспечивают моноаллельный характер экспрессии импринтированных генов на хромосомах отцовского или материнского происхождения, называют *эпигенотипом (импринтом)*.

При изучении механизмов импринтинга центральным является вопрос о молекулярной природе тех эпигенетических модификаций, в которых записана информация («память») о функциональной активности генов на материнских и отцовских хромосомах.

Высказывается предположение, что моноаллельное подавление активности импринтированных генов достигается теми же механизмами, которые обеспечивают тканеспецифичный характер экспрессии многих обычных (биаллельно функционирующих) генов.

Существующие представления об эпигенетических модификациях были получены в результате поиска молекулярных различий между материнскими и отцовскими копиями импринтированных генов. Наиболее изученной эпигенетической модификацией, которой отводится основная роль в обеспечении процессов импринтинга, является специфическое метилирование цитозиновых остатков ДНК по 5-му углеродному атому. Это единственная допустимая в физиологических условиях химическая модификация ДНК у позвоночных. Важнейшими особенностями метилирования ДНК являются, во-первых, стабильное сохранение в ряду многих поколений клеток, а, во-вторых, прямое или косвенное влияние на экспрессию генов.

В настоящее время установлено, что все известные импринтированные гены содержат области различного метилирования на двух родительских хромосомах, причем эти различия обязательны для их моноаллельной экспрессии. Необходимость процесса метилирования в обеспечении механизмов импринтинга была доказана в экспериментах на мышцах с дефектным геном ДНК-метилтрансферазы, у которых был утрачен моноаллельный характер экспрессии импринтированных генов *H19*, *Igf2*, *Igf2r* и *Snrpn*. У мышей, нокаутированных по гену метилтрансферазы, эмбриогенез останавливается на уровне 8 сомитов.

Гиперметилирование гена обычно подавляет его транскрипционную активность и в большинстве случаев обнаруживается на неактивных аллелях, но иногда метилированные последовательности присутствуют и на экспрессирующихся аллелях (*Igf2r*, *Igf2*, *Snrpn*). Дифференциальное метилирование родительских аллелей, как правило, наблюдается внутри или рядом с CG-богатými районами, которые нередко содержат разные типы прямых повторов. Выявлены некоторые характерные особенности таких повторов. Во-первых, между ними нет гомологии, во-вторых, длина единицы повтора может быть различной и, в-третьих, возможно любое расположение повторяющихся последовательностей по отношению к гену (рядом с геном с 5'-стороны, в 5'-нетранслируемой области, внутри интрона или в кодирующей части). Дифференциально метилированные районы в некоторых случаях перекрываются с районами, с которых транскрибируются некодирующие и антисмысловые РНК, причем транскрипты включают блоки tandemных повторов. Роль таких РНК не ясна, но предполагается, что они осуществляют какие-то регуляторные функции в импринтированных районах.

Практически все импринтированные гены содержат повторы, в частности, первый интрон гена *SNRPN* содержит структурно консервативные G-обогащен-

ные повторы, а недавно клонированный ген *MAGEL2* содержит прямые 21-нуклеотидные повторы, расположенные в промоторной области. По-видимому, повторяющиеся последовательности могут быть вовлечены в установку импринтинга и/или метилирования конкретного гена. Они могут служить мишенью для маркирования определенного аллеля за счет организации вторичной структуры ДНК, уникальной для одного из аллелей. Показано, что повторяющиеся последовательности создают некие свернутые структуры, узнаваемые гетерохроматин-специфическими белками. У млекопитающих метилирование ДНК может усиливать образование таких гетерохроматиновых структур, так как было показано, что метилирование CpG-районов изменяет структуру ДНК. Таким образом, связывание гетерохроматин-специфических белков с ДНК, имеющей измененную конформацию, подобную z-ДНК, которая, по-видимому, специфически стабилизируется метилированием CpG, может быть усилено, что приведет к полной инактивации импринтированных генов.

Это подтверждают результаты экспериментов по изучению времени репликации импринтированных хромосомных доменов в S-фазе митоза. Асинхронность репликации кластеров импринтированных генов на гомологичных хромосомах была показана с помощью гибридизации интерфазных ядер *in situ*. До репликации в ядре наблюдаются два гибридизационных сигнала, соответствующих материнскому и отцовскому аллелям гена. После репликации гибридизационный сигнал приобретает двоякую структуру.

Асинхронность вычисляется как соотношение двояких и одиночных сигналов. Асинхронность репликации была показана для генов *Igf2r*, *Igf2*, *H19*, *SNRPN*. Критический район для СА и СПВ на отцовской хромосоме реплицируется в S-фазе раньше. Время репликации в клеточном цикле коррелирует с уровнем активности генов и зависит от конденсации хроматина. Известно, что активно экспрессирующиеся гены обычно реплицируются в ранней S-фазе, а неактивные локусы реплицируются с запозданием.

Многочисленные исследования свидетельствуют о том, что транскрипционная активность гена существенно зависит от структурной организации хроматина в районе промотора и примыкающей области. Инактивация транскрипции обычно сопровождается уплотнением хроматина (гетерохроматинизацией), в результате чего ДНК становится менее доступной для РНК-полимеразы и транскрипционных факторов, необходимых для инициации транскрипции. Химическая природа модификаций хроматина до конца не ясна.

Установлено, что гиперацетилирование коровых гистонов нуклеосомы по некоторым лизиновым остаткам сопряжено с функциональной активностью генов, а также сопровождает деконденсацию хроматиновых структур высшего порядка. Кроме того, транскрипционно активный хроматин характеризуется пониженным содержанием линкерного гистона H1, который связывает нуклеосомы между собой и упаковывает их в фибриллу. Имеются также сведения о взаимосвязи метилирования ДНК с упаковкой хроматина. Например, было показано, что линкерный гистон H1 предпочтительно связывается с метилированными последовательностями ДНК. Кроме того, установлено, что негистоновые хроматиновые белки группы MeCP имеют повышенное сродство к метилированным последовательностям ДНК, причем сила их связывания в основном определяется плотностью метилированных CG-динуклеотидов, а не конкретной нуклеотид-

ной последовательностью. Некоторые из белков этой группы непосредственно подавляют транскрипцию. Так, например, в белке MeCP2, который в значительных количествах присутствует в ядре и связывается с метилированными CG-последовательностями всего генома, обнаружен специальный домен для подавления транскрипции генов.

Таким образом, функциональная активность импринтированных генов, помимо метилирования, в значительной степени определяется структурной организацией хроматина, что подтверждается явлениями асинхронной репликации и разной чувствительностью родительских аллелей к обработке нуклеазами. Исследование структуры хроматина в критическом районе хромосомы 15 показало, что промотор и первый экзон гена *SNRPN* гиперчувствительны к нуклеазам на отцовской хромосоме. Это свидетельствует о транскрипционно активном состоянии гена и, возможно, о том, что эта часть ЦИ контролирует отцовский эпигенотип. Район ЦИ, содержащий VD-экзоны и контролирующий переключение на материнский эпигенотип, оказался гиперчувствительным к нуклеазам на материнской хромосоме. Подтверждением того, что этот район содержит какие-то консервативные элементы, регулирующие структуру хроматина, явились эксперименты на трансгенной мушке *Drosophila* (см. раздел «Мутации центра импринтинга»).

Возможную связь СПВ с изменением структуры хроматина в критическом районе можно предполагать, исходя из анализа вариантов полиморфизма хромосомы 15. Экстремальные варианты полиморфизма короткого плеча хромосомы 15, представленные крупными блоками структурного гетерохроматина, или частичные перичентрические инверсии гетерохроматина из короткого плеча в длинное, выявленные у ряда пациентов с признаками СПВ, но без изменения статуса метилирования критического района, могут служить косвенным подтверждением этой гипотезы. В этих случаях можно предполагать наличие эффекта положения, когда конденсированное состояние гетерохроматина распространяет инактивирующий эффект на эухроматиновые районы, вызывая репрессию окружающих генов. Известно, что экспансия инактивации на соседние районы, содержащие функционирующие гены, может простирается на расстояние до 2 м.п.н. и более, как было показано для ряда X-аутосомных транслокаций.

Одним из ведущих направлений в изучении механизмов импринтинга является наблюдение за изменением эпигенетических свойств отцовских и материнских аллелей на протяжении последовательных стадий онтогенетического развития и анализа влияния эпигенотипа на функциональную активность импринтированных локусов. В результате многочисленных экспериментов на мышах была подробно изучена динамика метилирования и деметилирования генома в ходе онтогенеза. В частности, было показано, что метилирование импринтированных, равно как и неимпринтированных генов, теряется («стирается») на самых ранних стадиях развития гамет, а именно в первичных половых клетках эмбриона. Во всех экспериментах с такими клетками наблюдалась биаллельная экспрессия импринтированных локусов. Следовательно, на этом этапе эпигенетические различия между отцовскими и материнскими аллелями отсутствуют. Это подтверждают эксперименты, в которых после слияния зрелых лимфоцитов тимуса с клетками зародышевой линии на ранней стадии развития наблюдалось массивное деметилирование всего генома лимфоцита, включая импринтированные и неимпринтированные локусы.

Метилирование импринтированных локусов происходит на последующих этапах дифференцировки гамет. В овогенезе установление нового «импринта» происходит на стадии роста овоцита 1-го порядка. Срок установления «мужского» эпигенотипа в сперматогенезе окончательно не выяснен, но предполагается, что это происходит в сперматоцитах 1-го порядка до наступления (или во время) профазы 1-го деления мейоза. Основным ферментом, который обеспечивает метилирование *de novo* и поддерживает существующий паттерн метилирования в геноме млекопитающих, является ДНК-метилтрансфераза 1 (Dnmt1). Хотя недавно были обнаружены другие типы метилтрансфераз, их роль в установлении аллель-специфического метилирования импринтированных генов не доказана. Остается неясным механизм распознавания в отцовском и материнском гаметогенезе тех последовательностей, которые должны быть по-разному метилированы. В этом отношении представляет интерес недавнее обнаружение двух альтернативных способов сплайсинга 5'-экзонов гена *Dnmt1*, один из которых реализуется в овогенезе, а второй — в сперматогенезе. Оказалось, что в сперматоцитах 1-го порядка на стадии профазы 1-го деления мейоза содержится сплайсформа Dnmt1-мРНК, которая не транслируется и не дает белкового продукта. Овоцит-специфический сплайсинг гена *Dnmt1* сопровождается продукцией укороченных с N-конца молекул фермента, которые в большом количестве присутствуют в растущем овоците 1-го порядка и специфически метилируют будущие материнские аллели импринтированных генов. Возникает вопрос, каким образом в сперматогенезе происходит метилирование импринтированных локусов. Возможно, это происходит до наступления профазы I мейоза с участием соматической изоформы Dnmt1 или осуществляется другими, пока неизвестными типами ДНК-метилтрансфераз или особой формой Dnmt1.

Вскоре после оплодотворения, между стадией 8-клеточного эмбриона и бластоцистой, у мыши происходит общее массивное деметилирование геномной ДНК, к которому устойчивы лишь некоторые импринтированные локусы. Новое метилирование ДНК начинается после имплантации эмбриона и продолжается в ходе гастрюляции. Таким образом, аллель-специфический характер метилирования ДНК формируется постепенно в ходе эмбриогенеза, поэтому процесс импринтинга и метилирования может носить многоступенчатый характер и быть приурочен к определенной стадии развития. Результаты многочисленных исследований в этой области противоречат первоначальному представлению о том, что геномный импринтинг обусловлен инактивацией одного из родительских аллелей однажды и навсегда с момента оплодотворения.

Хотя роль метилирования в обеспечении аллель-специфической экспрессии генов несомненна, остается неясным, является ли метилирование первичным эпигенетическим сигналом, который стирается и устанавливается в гаметогенезе, или представляет собой некий вторичный процесс по отношению к более ранней стадии импринтинга и служит лишь для поддержания ранее установленного импринта. Помимо молекулярной природы эпигенетических модификаций изучение механизмов импринтинга предполагает выяснение следующих основных вопросов. К ним относятся, во-первых, биохимические этапы установления эпигенотипа импринтированных генов в гаметогенезе родителей и в ходе онтогенеза у потомка, во-вторых, влияние эпигенетической модификации генов на характер их экспрессии («расшифровка» импринта) и, в-третьих, поддержание «хромосомной памяти» в соматических тканях.



Предложены две модели смены эпигенотипа хромосом в гаметогенезе. Согласно первой, переключение эпигенотипа происходит только в той из гомологичных хромосом, которая унаследована от родителя противоположного пола, а вторую хромосому модификации не затрагивают. Вторая модель предполагает предварительное устранение («стирание») существующего эпигенотипа на обеих родительских хромосомах с последующим установлением импринта, соответствующего данному полу. За последние несколько лет в результате многочисленных исследований метилирования и функционирования импринтированных генов в клетках зародышевого пути были получены убедительные доказательства в пользу второго предположения.

Существенным является вопрос о том, как в соматической клетке происходит «расшифровка импринта», т.е. с помощью каких клеточных факторов происходит распознавание эпигенотипа и реализация конкретной программы функционирования генов. На примере самой изученной эпигенетической модификации — метилирования ДНК — показана возможность как прямого, так и косвенного влияния импринта на экспрессию конкретного гена.

В случае прямого воздействия метилированию подвергается сам импринтированный ген. На это реагируют определенные ДНК-связывающие белки и вызывают гетерохроматизацию метилированного локуса. В результате ограничивается доступ транскрипционных активаторов к ДНК и экспрессия гена прекращается. Действие многочисленных транскрипционных факторов напрямую зависит от метилирования ДНК. Среди них есть метилчувствительные активаторы и метилзависимые репрессоры (обе эти группы опосредуют инактивацию метилированного гена), а также метилчувствительные репрессоры и метилзависимые активаторы (обеспечивающие экспрессию метилированных генов). Во всех этих случаях метилирование затрагивает тот ген, который является объектом регуляции.

Косвенное влияние метилирования на экспрессию импринтированных генов предполагает модификацию не самого импринтированного гена, а расположенного в *цис*-положении (на той же хромосоме) другого гена — «импринтора». Функция последнего сводится к поддержанию моноаллельной экспрессии одного или нескольких импринтированных локусов в пределах данного кластера. Понятие о генах-«импринторах» возникло в связи с предложенной моделью конкурентной экспрессии, объясняющей механизм поддержания моноаллельного функционирования генов в соматических тканях (см. рис. 51). Эта модель объясняла функционирование кластера импринтированных генов на хромосоме 7 мыши, содержащего, помимо других локусов, ген *H19* с материнской экспрессией и ген инсулиноподобного фактора роста 2 (*Igf2*), активный на отцовской хромосоме. Локус *H19* кодирует нетранслируемую мРНК и является геном-«импринтором» для расположенного в *цис*-положении гена *Igf2*. Согласно этой модели, происходит конкуренция промоторов *H19* и *Igf2* за доступ к общему энхансеру, тесно сцепленному с геном *H19*. На материнской хромосоме, где промотор гена *H19* не подвергается метилированию, *H19* активно транскрибируется, находясь под сильным влиянием энхансера. Для промотора *Igf2*, в этом случае, энхансер не доступен, поэтому на материнской хромосоме ген *Igf2* не активен. На отцовской хромосоме, где промотор *H19* инактивирован метилированием, ген *Igf2* получает

доступ к энхансеру и активно транскрибируется. Впоследствии выяснилось, что за доступ к общему энхансеру с геном *H19* конкурирует не только *Igf2*-ген, но и ген инсулина *Ins*, который также активен на отцовской хромосоме. У экспериментальных мышей, несущих делецию материнской копии *H19*, происходит депрессия гена *Igf2* на материнской хромосоме и наблюдается биаллельная продукция *Igf2*. Незаконное метилирование промотора *H19* на материнской хромосоме также приводит к биаллельной экспрессии *Igf2*. У мышей с дефектным геном ДНК-метилтрансферазы наблюдается биаллельное функционирование *H19* и биаллельное «молчание» *Igf2*. Таким образом, экспрессия импринтированных генов *Igf2* и *Ins* контролируется посредством метилирования регуляторного гена-«импринтора» *H19*.

Сходным образом регулируется моноаллельная экспрессия гена, кодирующего рецептор инсулиноподобного фактора роста 2 (*Igf2r*) на хромосоме 17 мыши. Моноаллельная экспрессия гена *Igf2r* на материнской хромосоме сопровождается метилированием CG-островка, расположенного во втором интроне гена. Этот CG-островок является промотором для антисмыслового РНК-транскрипта (*Igf2r*-AS). На отцовской хромосоме отсутствие метилирования CG-островка сопровождается активной транскрипцией антисмысловой цепи. При этом транскрипция смысловой цепи невозможна. На материнской хромосоме, где CG-островок второго интрона метилирован, антисмысловый транскрипт не образуется, в результате чего становится возможным считывание смысловой цепи. Делеции интронного CG-островка в эксперименте приводят к прекращению транскрипции антисмысловой цепи и депрессии отцовского аллеля. Таким образом, метилирование гена-«импринтора» во втором интроне регулирует моноаллельную экспрессию гена *Igf2r* на материнской хромосоме.

Обращает на себя внимание тот факт, что гены-«импринторы» часто (или всегда) кодируют нетранслируемые РНК. Предполагается, что механизм конкурентной экспрессии с генами-«импринторами» является универсальным для поддержания в соматических тканях моноаллельной экспрессии всех импринтированных генов, в том числе и СПВ/СА-кластера. Однако экспериментальных подтверждений для района СПВ/СА эта модель до сих пор не получила. Таким образом, механизмы импринтинга, несмотря на значительное количество гипотетических моделей, во многом остаются неизученными.

Исследование эпигенетических механизмов регуляции экспрессии генов в норме и при патологии будет особенно актуальным в рамках функциональной геномики в ближайшее время. На сегодняшний день работы по картированию, клонированию и исследованию импринтированных генов, имеющих моноаллельную экспрессию, ставят больше вопросов, чем дают ответов. Практически не исследовано, каким образом устанавливается и поддерживается импринтинг, существуют ли какие-то специфические регуляторные элементы генома, ответственные за импринтинг, является ли метилирование единственным механизмом маркировки генов. Неизвестна роль антисмысловых и нетранслирующихся РНК, роль повторяющихся последовательностей, не существует пока единой модели импринтинга. Дальнейшее изучение ГИ будет иметь существенное значение для понимания тонких механизмов регуляции генной активности в онтогенезе и его связи с наследственными и онкологическими заболеваниями.

## Литература

- Лихтенштейн А.В., Киселева Н.П.* Метилирование ДНК и канцерогенез // Биохимия. 2001. Т. 66. С. 293–317.
- Genomic Imprinting / Ed. by W. Reik and A. Surani. Oxford Univ. Press. 1997. 272 p.
- Chromatin structure and gene expression. / Ed. by S.C.R. Elgin and J.L. Workman. Oxford Univ. Press. 2000. 328 p.
- Li E.* Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development // Nat. Rev. Genet. 2002. Vol. 3. P. 662–673.
- Mann J.R., Szabo P.E., Reed M.R., Singer-Sam J.* Methylated DNA sequences in genomic imprinting // Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr. 2000. Vol. 10. P. 241–257.
- Miozzo M., Simoni G.* The role of imprinted genes in fetal growth // Biol. Neonate. 2002. Vol. 81. P. 217–228.
- Nicholls R.D., Knepper J.L.* Genome organization, function, and imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes // Ann. Rev. Genomics Hum. Genet. 2001. Vol. 2. P. 153–175.
- Paulsen M., Ferguson-Smith A.C.* DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease // J. Pathol. 2001. Vol. 195. P. 97–110.
- Perk J., Makedonski K., Lande L.* et al. The imprinting mechanism of the Prader-Willi/Angelman regional control center // EMBO J. 2002. Vol. 21. P. 5807–5814.
- Polychronakos C., Kukuljic A.* Parental genomic imprinting in endocrinopathies // Eur. J. Endocrinol. 2002. Vol. 147. P. 561–569.
- Reik W., Walter J.* Genomic imprinting: parental influence on the genome // Nat. Rev. Genet. 2001. Vol. 1. P. 21–32.
- Sleutels F.S., Barlow D.P., Lyle R.* The uniqueness of the imprinting mechanism // Current Opinion in Genetics & Development. 2000. Vol. 10. P. 229–233.
- Walter J., Paulsen M.* Imprinting and disease // Semin. Cell Dev. Biol. 2003. Vol. 14. P. 101–110.

# Современные методы молекулярно-цитогенетического анализа и диагностика хромосомных патологий

Н.Б. Рубцов, Т.В. Карамышева, Т.А. Гайнер

## ВВЕДЕНИЕ

Хромосомные аномалии – одна из распространенных причин наследственных заболеваний и врожденных патологий человека. С реорганизацией хромосом часто связана злокачественная трансформация клеток, ведущая к развитию онкологических заболеваний. К сожалению, для решения многих проблем цитогенетической диагностики оказалось недостаточно использования только классических методов хромосомного анализа, базирующихся на дифференциальном окрашивании хромосомных районов. За пределами возможностей этих методов остаются идентификация материала малых сверхчисленных маркерных хромосом, дупликации, делеции, инсерции небольших районов, несбалансированные транслокации. Сравнение эффективности хромосомного анализа, проведенного методом 24-цветной флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), и методом GTG-дифференциальной окраски хромосом наглядно демонстрирует необходимость широкого внедрения в практическую диагностику современных молекулярно-цитогенетических методов исследования. Показано, что в случае гематологических заболеваний методами дифференциального окрашивания хромосом выявлялось и правильно идентифицировалось только 30% хромосомных перестроек, обнаруженных с помощью 24-цветной FISH. Еще около трети перестроек идентифицировалось неверно, а треть – оставалась совсем незамеченной. Еще хуже дело обстояло с анализом хромосомных перестроек в клетках солидных опухолей. Методы дифференциального окрашивания хромосом позволили выявить и правильно идентифицировать лишь 15% хромосомных перестроек, описанных с помощью 24-цветной FISH [Schroeck et al., 2000].

Современные методы молекулярно-цитогенетического анализа хромосомных аномалий значительно повысили разрешающую способность диагностики хромосомных патологий и ее надежность. Они сделали возможным проведение исследований при полном отсутствии митотических клеток, что позволило в ряде случаев полностью пересмотреть принципы проведения хромосомного анализа. В настоящей статье рассмотрены методы молекулярной цитогенетики, разработанные в последние годы, возможности их применения и перспективы дальнейшего развития.

## 6.1. ХРОМОСОМНЫЙ АНАЛИЗ В ДИАГНОСТИКЕ НАСЛЕДСТВЕННЫХ И ВРОЖДЕННЫХ ХРОМОСОМНЫХ ПАТОЛОГИЙ И ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

### Наследственные и врожденные хромосомные патологии

Большинство численных и структурных аномалий хромосом проявляется в виде разнообразных нарушений развития организма. Исключением является часть инверсий хромосомных районов и сбалансированных транслокаций. Анеуплоидии хромосом обычно либо несовместимы с жизнью, либо приводят к множественным порокам развития. Существует лишь небольшой список трисомий и моносомий, совместимых с рождением жизнеспособного потомства. Наименее серьезные нарушения развития вызывает анеуплоидия половых хромосом (45,X; 47,XYY; 47,XXX; 47,XXY). Известны примеры трисомии аутосом: 13-й (синдром Патау), 18-й (синдром Эдвардса) и 21-й (синдром Дауна). Зарегистрированы единичные случаи родов с трисомией хромосом 8, 9 и 22. Эти хромосомные патологии сопровождаются множественными пороками развития, резким снижением жизнеспособности и ранней постнатальной смертностью [Доклад научной группы ВОЗ, 1997]. Трисомии других аутосом являются причиной гибели плода уже на ранних стадиях эмбрионального развития. Частичные (по отдельным районам хромосом) трисомии и моносомии наблюдали в 4% обследованных беременностей [Hassold, 2000]. Обычно они являются следствием несбалансированных транслокаций, инсерций, делеций и дупликаций небольших хромосомных районов, формирования малых сверхчисленных хромосом. К сожалению, этот перечень полностью совпадает с приведенным выше списком хромосомных перестроек, диагностика которых серьезно затруднена в случае использования только «классических» методов хромосомного анализа. Некоторые хромосомные аномалии могут сохраняться в нескольких поколениях и не вызывать серьезных аномалий развития, в то время как другие приводят к формированию ярко выраженных клинических синдромов. Приведем лишь несколько примеров последних. Синдром тетрасомии 18p обычно связан с наличием сверхчисленной хромосомы  $i(18)(p10)$ . Синдром Паллистера—Киллиана обусловлен присутствием в части клеток изохромосомы  $i(12)(p10)$ . Синдром «кошачьего глаза» является результатом трисомии или тетрасомии района  $22pter \rightarrow q11$ . Для формирования синдрома Дауна не обязательна трисомия всей хромосомы 21. Вполне достаточно трисомии района  $21q22$  [Sharipo, 1999]. Большое значение для развития того или иного синдрома имеет положение точек разрыва, который происходит при хромосомной перестройке. Нередко их минимальное смещение приводит к принципиально иным последствиям. Например, у пациентов с делецией части района  $3pter \rightarrow p25$  наблюдается целый спектр различных аномалий развития: от нормального варианта до задержки физического развития, умственной отсталости, микроцефалии, нарушений развития сердечно-сосудистой системы, птоза и микрогнатии. Показано, что при сохранении на аномальной хромосоме 3 близко расположенных локусов  $D3S1585$  и  $D3S1263$  (район  $3p25$ ) делеция приводит лишь к несуществен-

ным отклонениям от нормального фенотипа [Philippis et al., 1994; Knight et al., 1995]. При делеции, затрагивающей только дистальный локус, развиваются значительно более серьезные нарушения, включающие поражение сердечно-сосудистой системы, задержку умственного развития и ряд других аномалий [Drumheller et al., 1996]. Таким образом, точное описание хромосомной аномалии нередко оказывается решающим фактором при постановке диагноза, определении прогноза и принятии решения о прерывании беременности.

## Цитогенетический анализ при онкологических заболеваниях

Анализ процесса малигнизации клеток и дальнейшей опухолевой прогрессии показал, что они тесно связаны с реорганизацией генома, которая нередко проявляется в виде структурных или численных изменений хромосом и их отдельных районов. В настоящее время известны множественные примеры хромосомных перестроек, которые либо обуславливают предрасположенность к развитию онкологических заболеваний, либо могут являться прямой причиной злокачественной трансформации [Mitelman et al., 1997]. Опухолевая прогрессия часто связана с появлением клеточных клонов, несущих новые хромосомные перестройки и отличающихся от исходного штамма рядом признаков, имеющих непосредственное значение для прогнозирования развития заболевания и выбора оптимальной стратегии лечения.

Результаты анализа 26 523 неоплазий, несущих различные хромосомные аномалии, были суммированы и опубликованы в пятом издании «Каталога хромосомных aberrаций при онкологических заболеваниях» [Mitelman et al., 1997]. Выявлены новые гены, изменение экспрессии которых в ряде случаев приводит к малигнизации клеток. Очевидной стала клиническая значимость данных хромосомного анализа [Rowley et al., 1993]. Вопрос о его практическом значении был недавно подробно рассмотрен [Рубцов, Карамышева, 2000]. Здесь мы отметим лишь некоторые особенности его проведения.

Хромосомы малигнизированных клеток печально известны своей «плохой» морфологией, крайне затрудняющей проведение «классического» цитогенетического анализа. После проведения курса химио- или радиотерапии крайне проблематичным становится даже получение препаратов метафазных хромосом. Решение было найдено благодаря переходу от изучения морфологии аномальной хромосомы к визуализации ДНК входящих в ее состав районов.

Это определило развитие цитогенетики злокачественных заболеваний в двух направлениях: 1 — создание и развитие новых методов анализа хромосомных перестроек неизвестного происхождения; 2 — создание методов выявления определенной хромосомной перестройки. Оба эти направления имеют большое практическое значение.

В настоящее время одним из основных методов идентификации хромосомного района (по входящей в его состав ДНК) является гибридизация нуклеиновых кислот *in situ*. В различных вариантах она является составной частью большинства современных методов молекулярно-цитогенетического анализа. Диапазон получаемых результатов варьирует от определения хромосомной принадлежности районов всех хромосом анализируемой клетки, выявления нарушения баланса хромосомных районов, до детекции транслокации, сопровождающейся локализацией точек разрывов с точностью до десятков тысяч пар нуклеотидов.

## 6.2. ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ГИБРИДИЗАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ *IN SITU*

Гибридикация нуклеиновых кислот *in situ* была разработана для локализации фрагментов нуклеиновых кислот в метафазных и профазных хромосомах. Но вскоре этот метод нашел широкое применение и в диагностических лабораториях, связанных с анализом хромосомных патологий. В его основе лежит создание препаратов ДНК, содержащих последовательности нуклеотидов, отвечающие определенным требованиям. В простейшем случае это последовательности, гомологичные участкам ДНК интересующего исследователя хромосомного района. Для их использования при гибридикации *in situ* необходимо введение в ДНК элементов, позволяющих выявлять меченую ДНК при микроскопическом анализе. В дальнейшем мы будем называть такую меченую ДНК — «ДНК-пробой». После получения или приобретения ДНК-пробы можно приступить к проведению гибридикации меченой ДНК и ДНК цитологического препарата. Если опустить мелкие, но очень важные для получения положительного результата пункты протокола, то гибридикация *in situ* заключается в денатурации ДНК-пробы и цитологического препарата с последующей совместной ренатурацией, обеспечивающей формирование дуплексов меченой ДНК и ДНК препарата. Несвязанная меченая ДНК отмывается, после чего проводится выявление (визуализация на цитологическом препарате) введенных в ДНК-пробу элементов.

В первых экспериментах таким элементом был тритий — радиоактивный изотоп водорода ( $^3\text{H}$ ). Замена последнего на определенные химические соединения обеспечила более высокий уровень разрешения и открыла путь к одновременному использованию большого числа ДНК-проб, новым методам регистрации и обработки результатов гибридикации *in situ*. Последнее привело к появлению нового раздела цитогенетики — **количественной молекулярной цитогенетики**, решению проблем которой уже было посвящено несколько крупных совещаний, таких как Европейские конференции по количественной молекулярной цитогенетике (EuroConferences on Quantitative Molecular Cytogenetics).

Сегодня мечение ДНК принято разделять на «прямое» и «непрямое». *Прямое мечение* предполагает введение в ДНК репортерных элементов (РЭ), которые могут непосредственно наблюдаться при микроскопии. В настоящее время в качестве РЭ используют различные флуорохромы, например: флуоресцеинизотиоцианат (FITC), родамин, диэтиламинокумарин (DEAC), аминотилкумарин (AMCA), техасский красный (TexRed), цианиновые красители (Cy3, Cy3,5, Cy5, Cy55, Cy7) и многие другие.

При *непрямом способе мечения* в качестве РЭ применяют также самые разные соединения (биотин, дигоксигенин, 2,4-динитрофенил), присутствие которых на цитологическом препарате выявляется «не прямо», а опосредованно, с помощью перечисленных выше флуорохромов, конъюгированных с молекулами, специфически связывающимися РЭ.

Непрямой вариант мечения ДНК-пробы позволяет добиться уровня сигнала, в несколько раз превышающего сигнал при использовании прямо меченной ДНК-пробы. Это объясняется присутствием трех-четырех молекул флуорохрома на молекуле антитела, специфичного к РЭ. Кроме того, в некоторых системах де-

Таблица 17

## Системы детекции непрямо меченных ДНК-проб

Трехцветное выявление ДНК-проб с использованием меченых антител и усилением сигнала			
Этап детекции	ДНК-проба, меченная биотином (детекция АМСА) Авидин-АМСА	ДНК-проба, меченная дигоксигенином (детекция Су3) Дигоксигенин-специфичные мышинные антитела	ДНК-проба, меченная ДНФ (детекция FITC)
1			
2	Авидинспецифичные, биотинилированные козьи антитела	Овечьи антитела, специфичные к Ig мыши, связанные с Су3	
3	Авидин-АМСА	Ослиные антитела, специфичные к Ig овцы связанные с Су3	ДНФ-специфичные кроличьи антитела
4	Авидинспецифичные, биотинилированные мышинные антитела		Козьи антитела, специфичные к Ig кролика, связанные с FITC
5	Авидин-АМСА		Ослиные антитела, специфичные к Ig козы, связанные с FITC
Трехцветное выявление ДНК-проб с использованием меченых антител без усиления сигнала			
Этап детекции	ДНК-проба, меченная биотином (детекция FITC) Авидин-FITC	ДНК-проба, меченная дигоксигенином (детекция Су3) Дигоксигенин-специфичные антитела овцы, связанные с Су3	ДНК-проба, меченная ДНФ (детекция DEAC)
1			ДНФ-специфичные кроличьи антитела, связанные с DEAC

текции существует возможность каскадного усиления сигнала (табл. 17). Последний может быть усилен несколькими последовательными обработками препарата. К сожалению, одновременно с интенсивностью сигнала растет уровень фона, что не позволяет проводить бесконечные циклы усиления.

Острота проблемы регистрации слабого сигнала значительно уменьшилась благодаря совершенствованию микроскопической техники и способов регистрации флуоресцентного сигнала. Охлаждаемые CCD-камеры позволяют накапливать сигнал в течение десятков минут и надежно регистрировать очень слабую флуоресценцию. Этим обусловлена тенденция все более широкого использования прямо меченных ДНК-проб, но и сегодня при одно- или двухцветной FISH чаще используется не прямое мечение.

Для мечения ДНК могут быть использованы самые разные методы. В некоторых случаях эффективным оказывается прямое введение в ДНК РЭ в результате химической модификации ДНК. Чаще ДНК-пробы метятся включением меченых предшественников с использованием ДНК-полимераз. Для крупных молекул ДНК эффективным является использование ник-трансляции. Если ДНК-проба представляет собой относительно короткий фрагмент, не превышающий



1,5–2 т.п.н., фланкированный известными последовательностями, то наиболее рациональным оказывается использование ПЦР. Необходимо учитывать, что даже в тех случаях, когда ДНК-проба соответствует фрагменту ДНК размером в сотни тысяч или млн пар нуклеотидов, для гибридизации *in situ* она должна быть подготовлена в виде молекул ДНК размером от 0,1 до 1 т.п.н. Для более крупных молекул ДНК-мишень на цитологическом препарате часто оказывается недоступной, либо доступной лишь частично. В ходе ПЦР происходит не только включение РЭ в ДНК, но и увеличение ее количества на несколько порядков. В связи с этим, ПЦР как метод мечения приобретает все большую популярность. Использование в ПЦР вырожденного или частично вырожденного праймера позволяет решить сразу три задачи: ввести в ДНК РЭ, разбить длинную молекулу ДНК на фрагменты размером 0,2–1,5 т.п.н., наработать необходимое количество ДНК-пробы. К сожалению, этот подход может быть реализован только для молекул ДНК достаточно большого размера.

Гибридизация ДНК-проб, гомологичных протяженным районам, имеет ряд особенностей. В составе такой ДНК-пробы находятся последовательности, гомологичные диспергированным повторам. Для подавления их гибридизации с ДНК цитологического препарата перед проведением FISH денатурированная ДНК-проба отжигается с 50–100-кратным избытком немеченой Cot1 ДНК человека (фракция высокоповторенной ДНК). В результате отжига основная масса меченой повторенной ДНК реассоциирует с Cot1 ДНК и таким образом выводится из процесса гибридизации с ДНК хромосом или интерфазных ядер.

Этот методический прием позволяет использовать ДНК-пробы, приготовленные на основе хромосомо- и районспецифичных ДНК-клонотек, огромных фрагментов геномной ДНК, клонированных в дрожжевых (YAC), бактериальных (BAC) и вирусных (PAC) векторах [Verma, Babu, 1994]. Метод FISH с супрессией гибридизации диспергированных повторов получил широкое распространение в диагностике хромосомных патологий и свое собственное название: *chromosomal in situ suppression hybridization* (CISS-гибридизация) [Lichter et al., 1988].

### 6.3. ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ РАЗВИТИЯ МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ХРОМОСОМНЫХ АНОМАЛИЙ

В соответствии с задачами молекулярно-цитогенетической диагностики методы выявления хромосомных аномалий могут быть разделены на три основные группы. К первой группе следует отнести методы выявления и описания хромосомных перестроек вне зависимости от того, с какой хромосомой или хромосомным районом они связаны. Вторая группа включает подходы, разработанные для выявления конкретных хромосомных аномалий и не дающие никакой информации о наличии или отсутствии других перестроек хромосом. К третьей группе методов относится анализ реорганизации индивидуальной хромосомы вне зависимости от локализации точек разрывов и воссоединений, имевших место в ходе этой перестройки. Для простоты дальнейшего изложения назовем первую группу – *методами общего анализа кариотипа*, вторую – *методами селективного хромосомно-*

го анализа, а третью — методами общего анализа индивидуальных хромосом. Такое разделение значительно облегчит дальнейшее их рассмотрение, так как, несмотря на ряд общих закономерностей развития этих методов (увеличение числа одновременно используемых ДНК-проб, совершенствование приборной базы), существуют и некоторые особенности, характеризующие каждую из групп. Если прогресс общего анализа кариотипа в большей степени связан с разработкой новых способов регистрации результатов гибридизации *in situ* и их обработки, то в основе создания новых методов селективного хромосомного анализа лежит, главным образом, получение новых комплектов ДНК-проб.

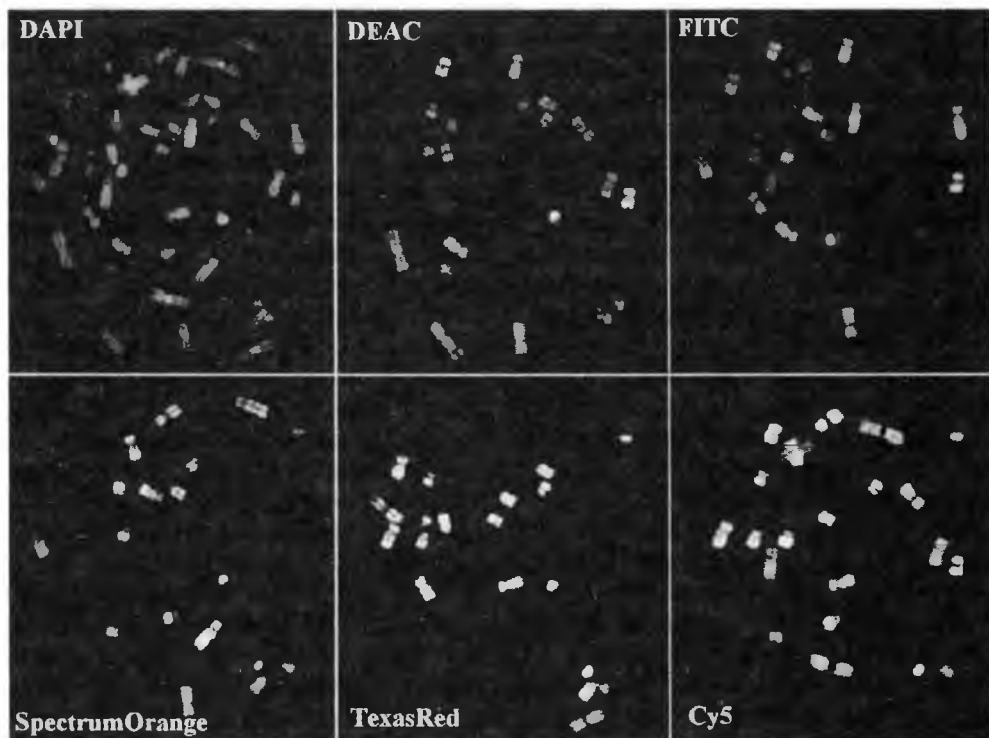
## Методы общего анализа кариотипа

Естественно, что для полного анализа кариотипа, т.е. анализа всех районов хромосом, используемые в работе ДНК-пробы должны перекрывать все районы всех хромосом человека. Такие ДНК-пробы или комплекты ДНК-проб используются при многоцветной FISH и сравнительной геномной гибридизации (comparative genome hybridization — CGH).

## 24-цветная флуоресцентная гибридизация *in situ*

Для определения в одном эксперименте отдельных районов хромосом необходимо использовать 24 уникальным образом меченные хромосомоспецифические ДНК-пробы (на аутосомы 1–22 и хромосомы X и Y). Впервые эта задача была решена в 1996 г. при разработке 24-цветной FISH [Spreicher et al., 1996; Schroeck et al., 1996]. В ее основе лежит комбинаторное мечение, при котором ДНК-пробы мечаются несколькими флуорохромами. Использование «n» флуорохромов обеспечивает уникальные варианты для мечения  $2^n - 1$  ДНК-проб. Уже пяти флуорохромов достаточно для мечения и последующей визуализации всех хромосом человека. При проведении FISH хромосомоспецифические ДНК-пробы окрашивают соответствующие хромосомы. В английском языке такие ДНК-пробы получили название «цельнохромосомных красителей» (whole chromosome paints) или сокращенно WCP. Будем и мы придерживаться этого сокращения. Обычно для комбинаторного мечения хромосомоспецифической ДНК человека используют следующие флуорохромы: FITC, Spectrum Orange, TexRed, Cy5, DEAC. WCP для 24-х цветной FISH создаются мечением ДНК индивидуальных хромосом уникальными комбинациями флуорохромов из этого списка. На рис. 52 (см. вклейку) приведен вариант мечения, предлагаемый фирмой Metasystems GmbH, который позволяет использовать для дальнейшей обработки программное обеспечение для автоматической классификации хромосом.

Технически анализ результатов 24-цветной FISH может быть проведен в двух вариантах. В одном из них используются комплекты эпифлуоресцентных фильтров и устройство для последовательной раздельной регистрации сигнала флуорохромов. Компьютерная обработка микроизображений, полученных при раздельной регистрации шести флуорохромов (пять флуорохромов использовалось для мечения ДНК-проб, шестой — DAPI, для общего окрашивания хромосом) (рис. 53), позволяет определять хромосомную принадлежность любого района как нормальных, так и перестроенных хромосом (см. вкл. рис. 54). M-FISH явля-



**Рис. 53.** Последовательная регистрация микроизображений метафазной пластинки после FISH с комбинаторномеченными пробами

ется общим обозначением для всех методов многоцветной FISH (multifluor, multicolor или multiplex FISH), использующих этот подход.

Альтернативное техническое решение было использовано при разработке *спектрального кариотипирования* (spectral karyotyping — SKY). В этом случае для каждой точки микроизображения снимается полная спектральная характеристика. Процесс осуществляется с помощью приборной базы «Spectral imaging», которая хорошо зарекомендовала себя ранее в промышленности и разнообразных исследованиях, требующих точного описания спектральных характеристик объекта. Она позволяет в ходе одного измерения получать спектральные кривые для всех точек изображения, вне зависимости от того, связано ли это с эпифлуоресценцией или с традиционной световой микроскопией. Такой способ регистрации сигнала оказался менее чувствителен к различиям в интенсивности сигналов и позволяет достичь лучшего отношения сигнал / шум. При спектральном кариотипировании хромосом человека так же, как при M-FISH, для создания WCP используют пять флуорохромов: один работает в зеленой области спектра, два — в красной и два — в инфракрасной. При возбуждении и эмиссии всех флуорохромов требуется один и тот же комплект фильтров, что позволяет избежать их последовательной смены, промежуточных фокусировок, и, следовательно, связанных с этим проблем, таких как пространственный сдвиг изображения, определе-

ние пороговых значений и сегментационных масок. В одном акте экспозиции полная спектральная характеристика испускаемого света записывается одновременно для каждой точки изображения. На основании анализа спектральных кривых определяется наличие или отсутствие в данной точке конкретных флуорохромов. Следующим шагом является процедура классификации, выполняемая с помощью специального программного обеспечения, которое позволяет определять хромосомную принадлежность анализируемого материала. Это обеспечивает надежную идентификацию (с точностью до хромосомы) материала маркерных хромосом, а также дериватов хромосом, возникших в результате разнообразных перестроек [Macville et al., 1999]. Большим достоинством метода SKY является то, что одновременно с регистрацией спектральных характеристик анализируется окрашивание флуорохромом DAPI, которое после обработки специальной программой улучшения изображения достигает по своему качеству уровня дифференциальной исчерченности хромосом, получаемого при GTG-окрашивании. Возможностью параллельного анализа результатов SKY и качественной дифференциальной окраски позволяет более точно определять точки разрывов.

К несомненным достоинствам SKY относится возможность использования флуорохромов с перекрывающимися спектрами возбуждения и эмиссии, что расширяет список веществ, пригодных к использованию в SKY [DGS, 1998].

### **Межвидовое цветное сегментирование хромосом (RxFISH)**

Использование WCP позволяет определять хромосомную принадлежность индивидуальных районов хромосом, но не дает возможность регистрировать внутривидовые перестройки. Для этого требуются специфические отдельным районам хромосом ДНК-пробы [Mueller et al., 1997; Mueller et al., 1998]. В качестве таких проб были использованы WCP двух видов гиббонов: *Hylobates concolor* и *Hylobates syndactylus*. Сегментационное окрашивание хромосом человека при использовании WCP гиббонов обусловлено многочисленными межхромосомными перестройками, различающими хромосомы человека и гиббонов. Разработанный метод получил название RxFISH. В отличие от 24-цветной FISH, он позволяет выявлять часть внутривидовых перестроек. ДНК-пробы, используемые в RxFISH, мечены комбинацией трех флуорохромов, что обеспечивает всего лишь семь псевдоцветов. В эти цвета окрашиваются отдельные сегменты хромосом человека, создавая цветную исчерченность хромосом (см. вкл. рис. 55). Очевидно, что, несмотря на всю фантастичность картины RxFISH, использование этого метода имеет достаточно серьезные ограничения: перестройки хромосом, происходящие внутри одного цветного Rx-бэнда, не могут быть выявлены с помощью этого метода, если они не приводят к значительным и легко видимым изменениям его размера. Интересной методической особенностью RxFISH является возможность ее проведения без супрессии гибридизации повторенных последовательностей. Авторы полагают, что это оказалось возможным благодаря различию последовательностей диспергированных повторов гиббонов и человека.

К недостаткам RxFISH можно отнести большой размер многих цветных районов. Такие хромосомы как 15, 18, 19, 21, 22, X и Y представляют собой один одноцветный бэнд каждая. Использование в будущем большего числа флуорохро-

мов и новых ДНК-проб, полученных благодаря использованию искусственных хромосом или микродиссекции метафазных хромосом, может значительно повысить разрешающую способность данного метода.

### **Сравнительная геномная гибридизация (CGH)**

Для использования в диагностике хромосомных патологий методов M-FISH, SKY и RxFISH необходимы препараты метафазных хромосом пациента. Это требование не распространяется на метод сравнительной геномной гибридизации. CGH позволяет выявлять нарушение баланса отдельных хромосомных районов даже в том случае, когда в распоряжении экспериментатора находится лишь небольшой фрагмент фиксированного и хранящегося долгие годы образца ткани или один единственный бластомер [Voullaire et al., 1999; 2000]. Суть метода заключается в количественном сравнении результатов двухцветной CISS-гибридизации со стандартными хромосомами человека двух образцов меченой ДНК: стандартной (референтной) геномной ДНК человека и ДНК, выделенной из анализируемого образца. При различии в опытных и контрольных образцах представленности хромосомных районов в гомологичных районах стандартных хромосом после CISS-гибридизации наблюдается отклонение в соотношении интенсивности сигналов опытной и референтной ДНК-проб [Du Manoir et al., 1993; Piper et al., 1995]. CGH позволяет оценивать и выявлять нарушения количественной представленности хромосомных районов размером не менее 10 млн п.н. Перспективным направлением развития CGH является матричная CGH (matrix-CGH) [Solinas-Toldo et al., 1997]. Ускорение проведения анализа, повышение его эффективности и уровня разрешения достигается полной автоматизацией процедур приготовления чипа и анализа результатов гибридизации [Beheshti et al., 2002].

Завершая обзор методов общего анализа кариотипа, кратко рассмотрим возможности и ограничения их использования. Для проведения M-FISH, SKY и RxFISH необходимы препараты метафазных хромосом пациента, в то время как для CGH достаточно иметь образец геномной ДНК анализируемых клеток. При диагностике хромосомных патологий в клетках солидных опухолей с помощью CGH основной проблемой является выделение клеток опухоли из нормального окружения. Контаминация опухолевых клеток клетками нормальной ткани приводит к значительным искажениям окончательных результатов. Заметим также, что CGH дает информацию только о нарушении баланса хромосомных районов (делеции и дупликации хромосомных районов, увеличение копийности хромосом). Хромосомные перестройки, не приводящие к таким нарушениям (транслокации, инверсии), не могут быть обнаружены с помощью CGH. В отличие от CGH методы 24-цветной FISH эффективны при выявлении межхромосомных перестроек, затрагивающих негомологичные хромосомы, вне зависимости приводят они к изменению копийности хромосомных районов или нет. Обнаружение внутривнутрихромосомных перестроек остается за пределами возможностей методов M-FISH. Следует отметить еще одну общую проблему всех методов M-FISH. В процессе распластывания фиксированных метафазных хромосом на поверхности стекла происходит смещение ДНК соседних хромосомных районов, а это, в свою очередь, приводит к формированию в «пограничном районе» новой комбинации флуорохромов. Таким образом, изображение перестроенной хромосомы с

инсерцией небольшого района соответствующей хромосомы может не отличаться от вида нормальной хромосомы или результата транслокации двух других хромосом. Определение хромосомного происхождения района превращается в серьезную проблему не только в случае небольших инсерций, но и при транслокациях хромосом, если WCP одной из них отличается от второй наличием одного или двух дополнительных флуорохромов. Пограничный район в перестроенной хромосоме в этом случае содержит все флуорохромы, использованные для мечения этих двух WCP. При применении автоматического классификатора хромосом это приводит к сдвигу границы транслокации на расстояние от полубэнда до целого бэнда. В случае переноса хромосомного района такого размера на хромосому реципиента, WCP которой отличается одним-двумя дополнительными флуорохромами относительно WCP хромосомы донора, выявить хромосомную перестройку обычно не удается. Наш опыт анализа сложных хромосомных перестроек при онкологических заболеваниях подтверждает существование таких проблем.

## Методы селективного хромосомного анализа

Эффективное использование методов селективного хромосомного анализа предполагает наличие предварительной информации о существовании определенной хромосомной перестройки: перестройки, связанной с конкретными хромосомами, или о наличии аномальной хромосомы неизвестного происхождения. Такая информация может появиться в результате проведения медицинского обследования пациента или хромосомного анализа, выполненного с использованием методов классической цитогенетики. Примерами служат хромосомные синдромы, имеющие достаточно четкое клиническое проявление. Выявление определенной хромосомной аномалии имеет значение при диагностике многих гематологических нарушений и солидных опухолей.

## Использование ДНК-проб для выявления численных хромосомных аномалий

В диагностике численных хромосомных аномалий существуют случаи, при которых невозможно или крайне затруднено получение препаратов метафазных хромосом (проведение пренатальной диагностики численных хромосомных патологий при использовании клеток плода, выделенных из кровотока матери, анализ хромосомных нарушений при онкологических заболеваниях после проведения курса химиотерапии). Для выявления численных хромосомных патологий при проведении обследования таких пациентов разработаны специальные ДНК-пробы. ДНК-пробы фирмы VYSIS, предназначенные для идентификации хромосом в метафазных пластинках и определения их числа в интерфазных ядрах, получили название — *хромосомных нумераторов* (chromosome enumerator probes — CEP). В дальнейшем мы тоже будем использовать эту аббревиатуру для обозначения данного типа ДНК-проб.

Рассмотрим использование CEP при проведении пренатальной диагностики. Комбинации CEP широко используются для определения численных аномалий хромосом 13, 18, 21, X и Y. Метод FISH с интерфазными ядрами некультивированных амниотических клеток или ядерных эритроцитов плода позволяет выявлять анеуплоидии этих хромосом. Однако необходимо помнить, что CEP разра-

ботаны для идентификации интактных хромосом и определения числа их копий в интерфазных ядрах. Эта техника не может дифференцировать нормальную хромосому и ее дериват, содержащий лишь небольшой район исходной хромосомы, в котором локализованы последовательности ДНК, гомологичные ДНК CEP. Как следствие, этот метод не способен дифференцировать нормальный кариотип 46,XX и достаточно часто встречающийся вариант хромосомной патологии, приводящей к синдрому Шерешевского – Тернера: 46,X+mar, при котором маркерная хромосома содержит прицентромерный район X-хромосомы. В результате, для отличия кариотипа 46,XX от 46,X,+r(X)(p11;q11) требуются дополнительные исследования.

Однако отметим, что при использовании для диагностики клеток плода, выделенных из периферической крови матери, интерфазная цитогенетика дает практически единственный шанс для выявления анеуплоидии хромосом. Анализ численных хромосомных патологий с использованием CEP можно проводить на отдельных бластомерах. Для таких работ фирмой VYSIS создан специальный комплект ДНК-проб (MultiVysion PGT) (обнаружены анеуплоидии хромосом 13, 18, 21, X и Y).

Примером использования CEP при хромосомном анализе онкологических заболеваний является изучение числа хромосом 3, 7, 17 при карциноме мочевого пузыря. Вариант обследования является неинвазивным, так как исследуются клетки, изолированные из мочи пациента.

### **Использование ДНК-проб для выявления микроделеций и транслокаций хромосом**

Одним из наиболее впечатляющих примеров использования FISH для выявления или уточнения определенных хромосомных патологий является использование ДНК-проб для обнаружения микроделеций хромосомных районов, приводящих к различным патологиям развития. Для этого применяются клонированные уникальные последовательности ДНК, локализованные в районе, потеря которого приводит к развитию синдрома. Для обозначения ДНК-проб, созданных для детекции определенных локусов, мы будем использовать термин – *идентификатор специфичных хромосомных локусов* (locus specific identifier – LSI). В качестве примера использования LSI можно привести выявление делеций в районе 15q11→q13, с которыми связаны синдромы Прадера–Вилли (СПВ) и Ангельмана (CA). В настоящее время существует набор клонированных фрагментов ДНК (локусы *D15S10*, *D15S15*, *SNRPN*, *GABRB3*), на базе которых созданы ДНК-пробы для определения таких делеций.

Коммерчески доступные наборы для диагностики определенных делеций обычно включают контрольные клонированные последовательности, локализованные в удаленных районах той же хромосомы. Примеры ДНК-проб, используемых для регистрации делеций в области 15q11→q13, приведены на рис. 56 и в табл. 18. В таблице приведена также информация о микроделеционных синдромах, связанных с определенными районами хромосом 4, 5, 7, 15, 17, 22 и X, и о коммерчески доступных LSI, разработанных для детекции делеций соответствующих локусов.

Таблица 18

## Синдромы, возникающие при микроделециях хромосомных районов

Синдром	Район делеции	Локусы обнаружения / контроля
Синдром Вольфа–Хиршхорна	4p16.3	<i>WHS Region/CEP 4</i>
Синдром кошачьего крика	5p15.2	<i>D5S721, D5S1514E, D5S1518E, D5S630, D5S2064, D5S23/ EGR1 (5q31)</i>
Синдром Вильямса	7q11.23	Elastin <i>LIMK1, D7S613/D7S486, D7S522 (7q31)</i>
Синдром Прадера–Вилли–Ангельмана	15q11–q13	<i>SNRPN, D15S11, D15S10, D15Z1/PML (15q22)</i>
Синдром Миллера–Дикера	17p13.3	<i>LIS1/RARA (17q21.1)</i>
Синдром Смита–Мажениса	17p11.2	<i>SMS Region/RARA (17q21.1)</i>
Синдром ДиДжорджи	22q11.2	<i>N25 (D22S75)/ARSA (22q13)</i>
VCFS/CATCH-22	22q11.2	<i>TUPLE 1/ARSA (22q13)</i>
Дефицит стероидной сульфатазы (X-сцепленный ихтиоз)	Xp22.3	<i>STS/CEP X</i>
Синдром Кальмана	Xp22.3	<i>KAL/CEP X</i>

Проблема обнаружения конкретных хромосомных перестроек актуальна и для хромосомного анализа малигнизированных клеток при онкологических заболеваниях. В этих случаях часто возникает необходимость проведения исследований на материале, не содержащем делящихся клеток. Рассмотрим некоторые примеры.

Транслокация  $t(8;21)(q22;q22)$  характерна для острого миелоидного лейкоза типа M2. Такая транслокация приводит к формированию химерного гена *AML1/ETO*. Ген *AML1 (RUNX1)* локализован в районе 21q22, ген *ETO (CBFA2T1)* в районе 8q22 (см. вкл. рис. 57). Использование проб *LSI AML1* и *LSI ETO* позволяет выявить  $t(8;21)(q22;q22)$  даже при наличии на цитологическом препарате



Рис. 56. Локализация зондов LSI, используемых для детекции микроделеций в районах 15q11–q13 и 22q11.2



только интерфазных ядер (см. вкл. рис. 58). Нормальные клетки содержат два сигнала, соответствующих хромосоме 8, и два сигнала, соответствующих хромосоме 21. В клетках, несущих  $t(8;21)$ , выявляется по одному сигналу, соответствующему интактным хромосомам 8 и 21, и пара двухцветных сигналов, соответствующих перестроенным хромосомам  $der(8)t(8;21)$  и  $der(21)t(8;21)$ .

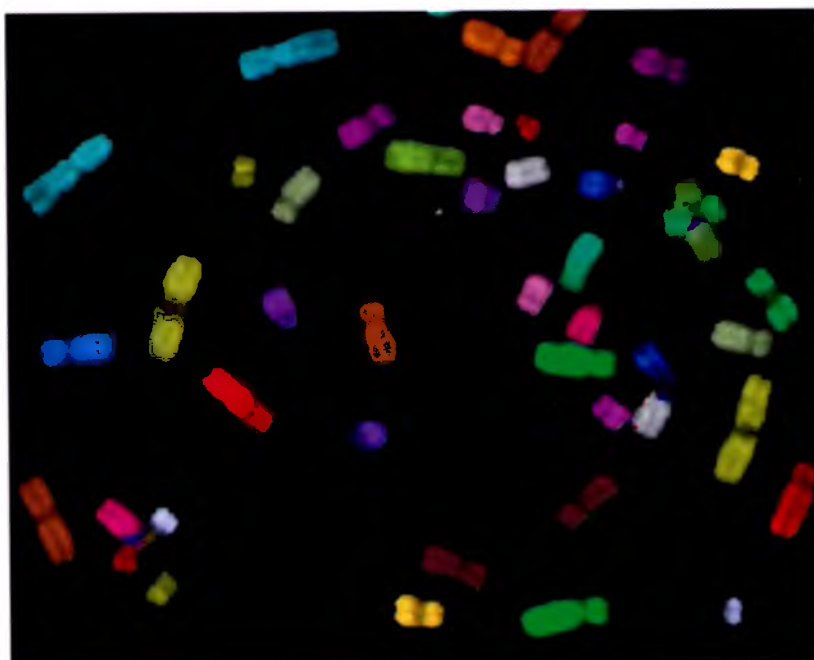
Аналогичным образом может быть выявлена транслокация  $t(15;17)(q22;q21.1)$ , вовлекающая гены *PML* and *RARA*;  $inv(16)(p13q22)$  или  $t(16;16)(p13;q22)$ , а также ряд других перестроек хромосом. Идентификация хромосомных перестроек с точками разрывов в  $16p13$  и  $16q22$  позволяет выделить определенную группу больных среди пациентов с острой миелоидной лейкемией. Хромосомные aberrации с такими точками разрывов встречаются либо в виде  $inv(16)(p13;q22)$ , либо достаточно редко как  $t(16;16)(p13;q22)$ . Инверсия в хромосоме 16 часто связана с FAB  $M4_{EO}$  подтипом острой миелоидной лейкемии (ОМЛ). Она также наблюдается при типе  $M4$  без эозинофилии и в  $M2$  подтипе [Marlton et al., 1995]. Для больных с ОМЛ и  $inv(16)$  только эта хромосомная аномалия имеет прогностическое значение [Marlton et al., 1995, Ghaddar et al., 1995]. Следует заметить, что ОМЛ с  $inv(16)$  представляет собой один из самых благоприятных ее вариантов, при котором число пациентов с ремиссией более пяти лет достигает почти 50%. В то же время среди пациентов с ОМЛ и  $inv(16)$  наблюдается более высокая частота рецидивов, которая, однако, может быть уменьшена при терапии более высокими, чем стандартные, дозами Ага-С [Marlton et al., 1995]. Таким образом, надежная идентификация  $inv(16)$  имеет не только прогностическое значение, но также важна для определения стратегии химиотерапии. Для решения этой проблемы были получены  $16p$  и  $16q$  специфичные ДНК-пробы. При CISS-гибридизации они дают отчетливые сигналы, окрашивая каждое из плеч хромосомы в свой цвет. Перичентрическая инверсия хромосомы 16 приводит к чередованию цветов в каждом плече, позволяя легко детектировать перестройку даже на препаратах очень низкого качества [Chudoba et al., 1996] (см. вкл. рис. 59).

Для определения  $inv(16)(p13;q22)$  или  $t(16;16)(p13;q22)$  может быть использован набор ДНК-проб, специально подготовленный для этой цели на базе LSI CBFV. Совмещенное положение нуклеотидных последовательностей ДНК, отстоящих друг от друга на расстоянии 50 т.п.н. и маркирующих хромосомные районы, лежащие по разные стороны от точки разрыва в  $16q22$ , означает отсутствие инверсии или транслокации. Разделение сигналов свидетельствует о наличии хромосомной перестройки. Анализ может проводиться как на метафазных хромосомах, так и на интерфазных ядрах.

Среди хромосомных перестроек, наиболее характерных при гематологических нарушениях, стоит выделить перестройки, затрагивающие ген *MLL*, локализованный в районе  $11q23$ . Выявлено более 30 вариантов транслокаций в этом районе. Наиболее часто встречаются следующие хромосомные перестройки:  $t(4;11)(q21;q23)$ ,  $t(9;11)(p22;q23)$  и  $t(11;19)(q23;p13)$ . Более того, примерно в 25% транслокаций, вовлекающих район  $11q23$ , имеет место также делеция с точками разрывов, одна из которых расположена в локусе *MLL*, а вторая — более дистально. В связи с этим для анализа подобных перестроек наиболее эффективно использовать комбинацию ДНК-проб из этого района, меченных разными флуорохромами (см. вкл. рис. 60). В интерфазных ядрах клеток, несущих нормальные

Хро- мо- сома	FITC	Spe Ora	Tec Dra	Cy5	DEAC	Полоса меты
1				Yellow		Yellow
2					Light Blue	Light Blue
3			Pink			Pink
4	Green					Green
5		Red				Red
6	Green			Yellow		Light Green
7				Yellow	Light Blue	Brown
8			Pink	Yellow		Orange
9		Red		Yellow		Green
10	Green				Light Blue	Light Green
11	Green		Pink			Purple
12	Green	Red				Dark Green
13			Pink		Light Blue	White
14		Red			Light Blue	Dark Blue
15			Pink			Pink
16	Green			Yellow	Light Blue	Orange
17	Green		Pink	Yellow	Grey	Pink
18	Green	Red		Yellow		Purple
19			Pink	Yellow	Light Blue	Pink
20		Red		Yellow	Light Blue	Light Green
21			Pink	Yellow		Light Purple
22	Green		Pink		Light Blue	Red
X	Green	Red			Light Blue	Blue
Y			Pink			Purple

**Рис. 52.** Комбинаторное мечение WCP для проведения 24-цветной FISH, рекомендуемое Metasystems GmbH



**Рис. 54.** 24-цветная FISH WCP с метафазными хромосомами человека

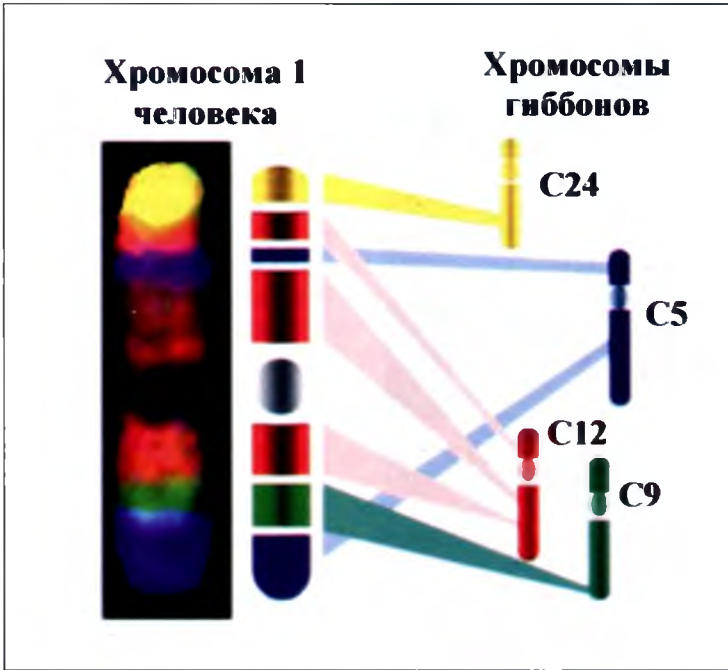


Рис. 55. Цветное сегментирование хромосомы 1 человека после RxFISH

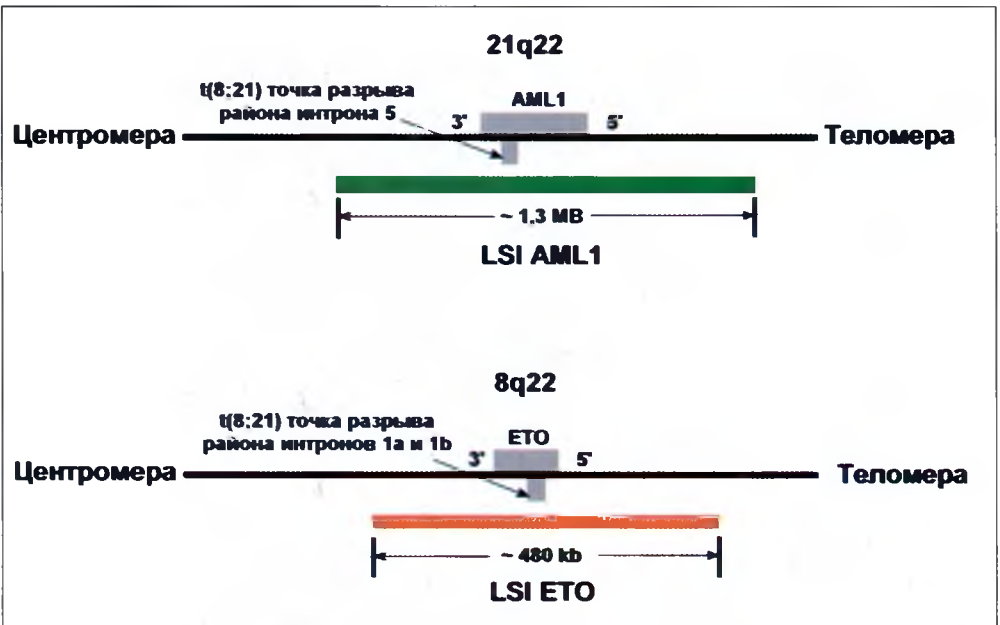
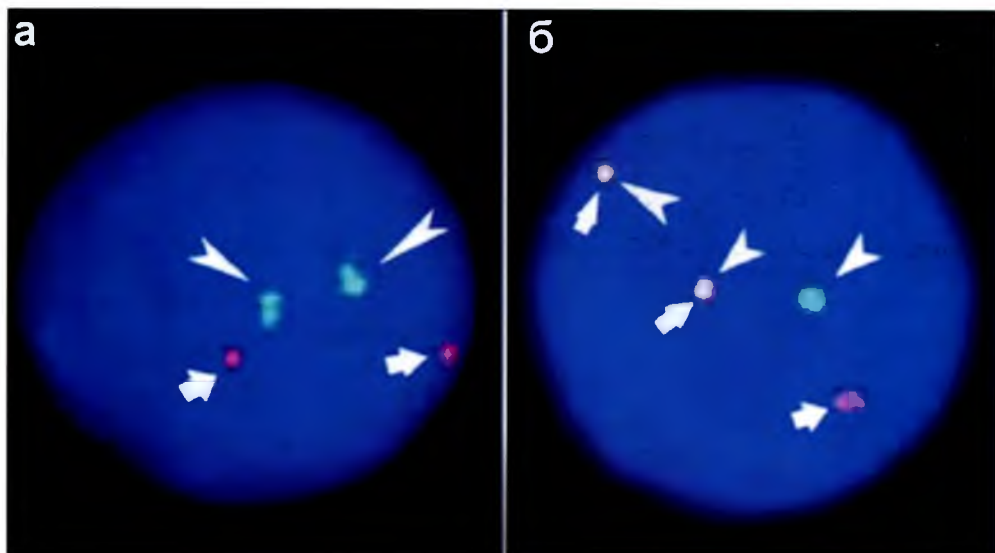
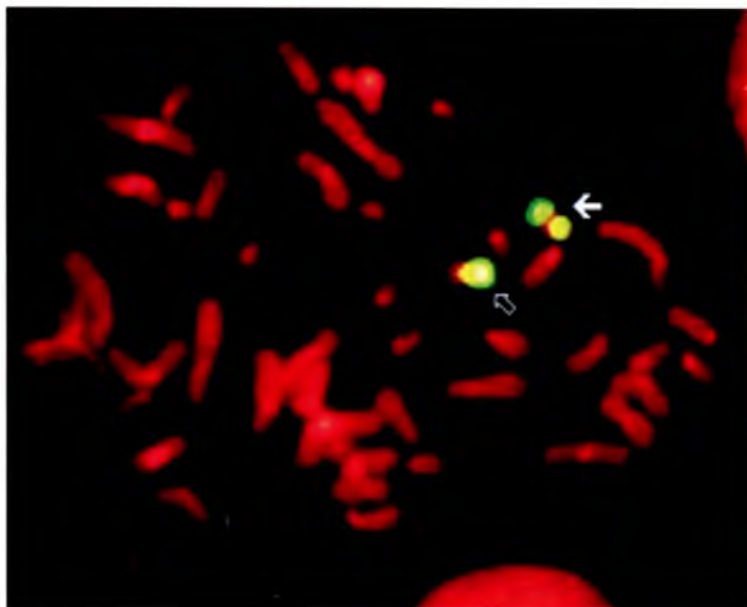


Рис. 57. Организация районов хромосом 8 и 21, вовлекаемых в формирование транслокации  $t(8;21)(q22;q22)$ , характерной для острого миелоидного лейкоза типа M2, и ДНК-пробы, используемые для ее выявления

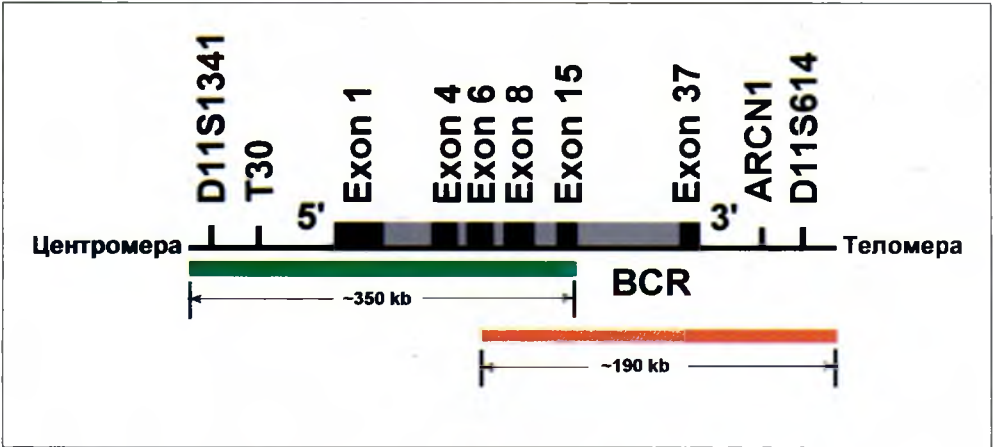


**Рис. 58.** Выявление транслокации  $t(8;21)(q22;q22)$ , характерной для острого миелоидного лейкоза типа M2, с использованием ДНК-проб LSI AML1 и LSI ETO.

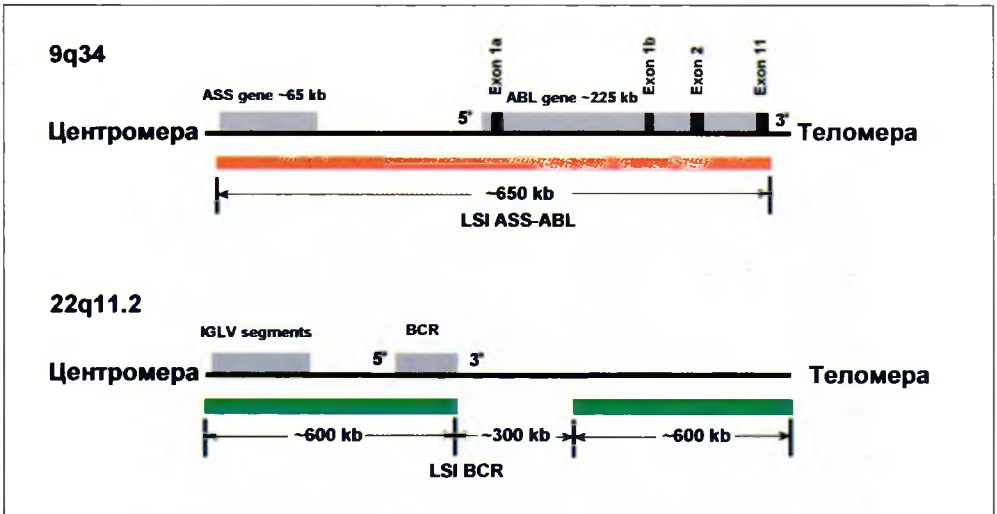
Красные сигналы соответствуют району 21q22 (указаны стрелками «>»), зеленые – району 8q22 (указаны стрелками «>») (а, б). Желтые сигналы (совмещение красных и зеленых, указаны стрелками «>» и «>») соответствуют районам транслокаций



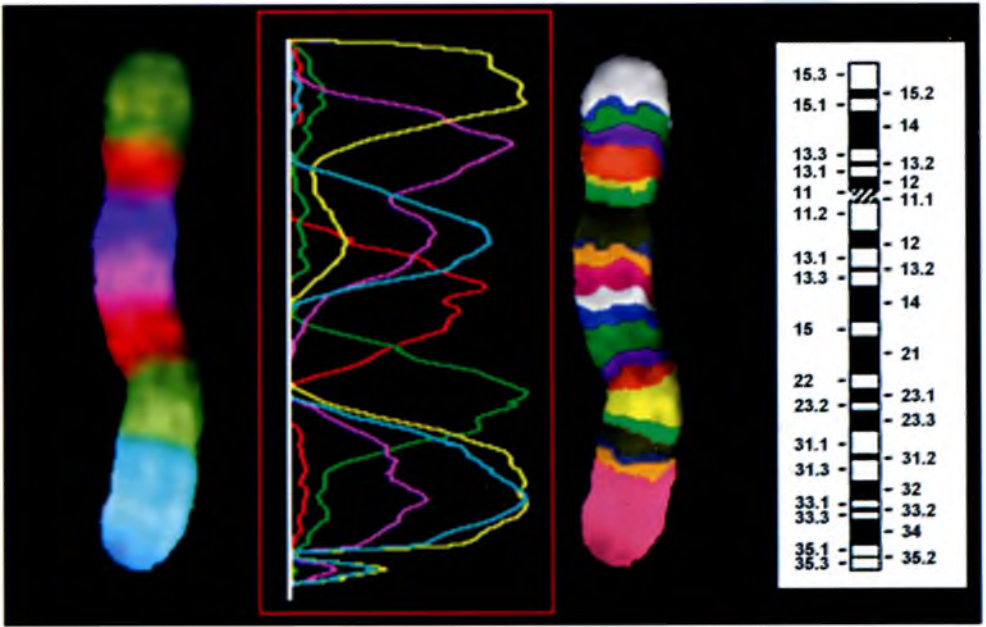
**Рис. 59.** Хромосомные перестройки:  $inv(16)(p13;q22)$  или  $t(16;16)(p13;q22)$ . ДНК-проба специфична 16q району (пояснения в тексте)



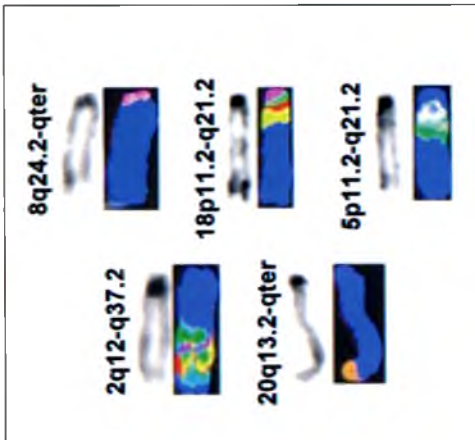
**Рис. 60.** Организация района 11q23 и ДНК-проб, используемых для выявления затрагивающих его хромосомных перестроек



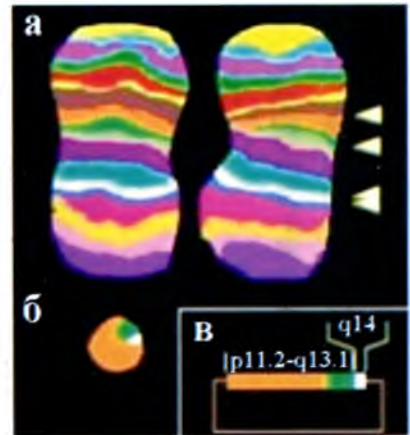
**Рис. 61.** Организация локусов 9q34, 22q11.2 и ДНК-проб, используемых для выявления транслокации t(9;22)(q34;q11.2)



**Рис. 62.** Многоцветное окрашивание хромосомы 5 человека (слева), приведены результаты FISH семи районспецифичных ДНК-клонотек; профили интенсивности пяти флуорохромов, использованных для мечения ДНК-клонотек; результаты перевода интенсивности сигналов флуорохромов в псевдоцвета; идиограмма хромосомы 5 человека



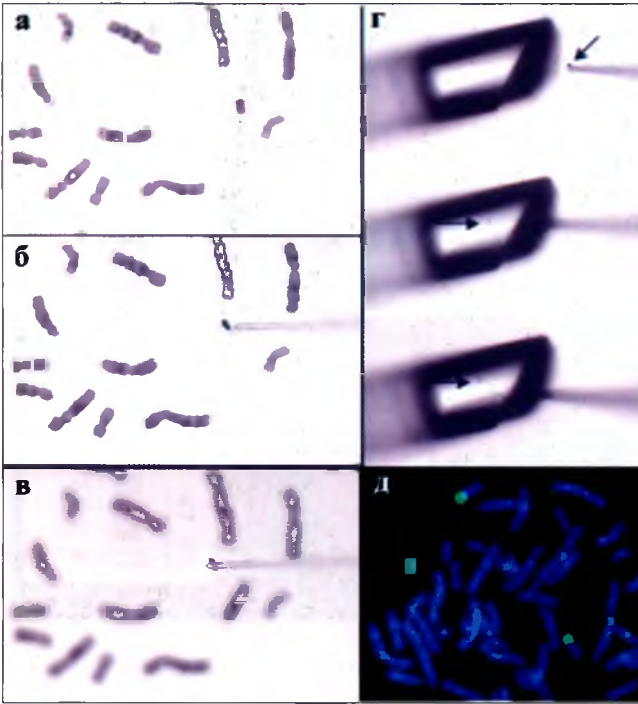
**Рис. 63.** Анализ маркерной хромосомы, обнаруженной в клетках больного острым миелоидным лейкозом. Определенные локализации и ориентации районов хромосом 2, 5, 8, 18 и 20



**Рис. 64.** Анализ маркерной хромосомы у пациента с острым миелоидным лейкозом

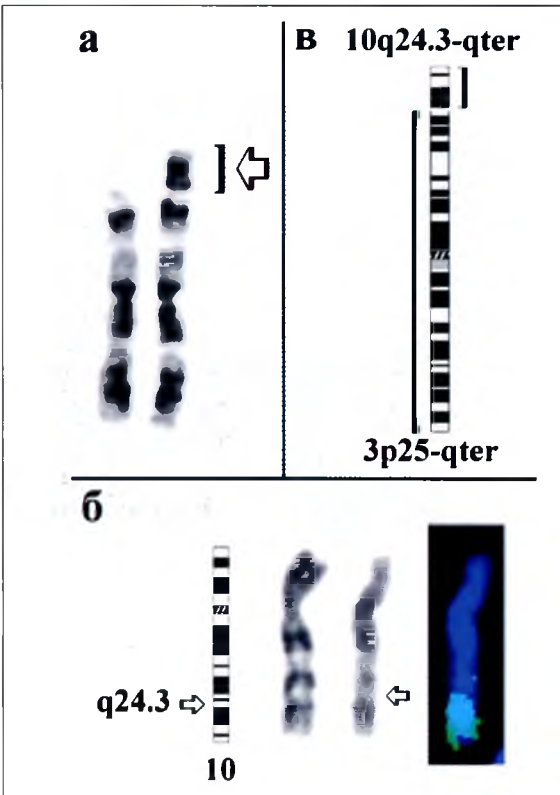
а — многоцветное окрашивание (МЦВ) гомологов хромосомы 11 человека; б — МЦВ маркерной хромосомы; в — схема организации маркерной хромосомы. Стрелками обозначены районы хромосомы 11, входящие в состав маркерной хромосомы





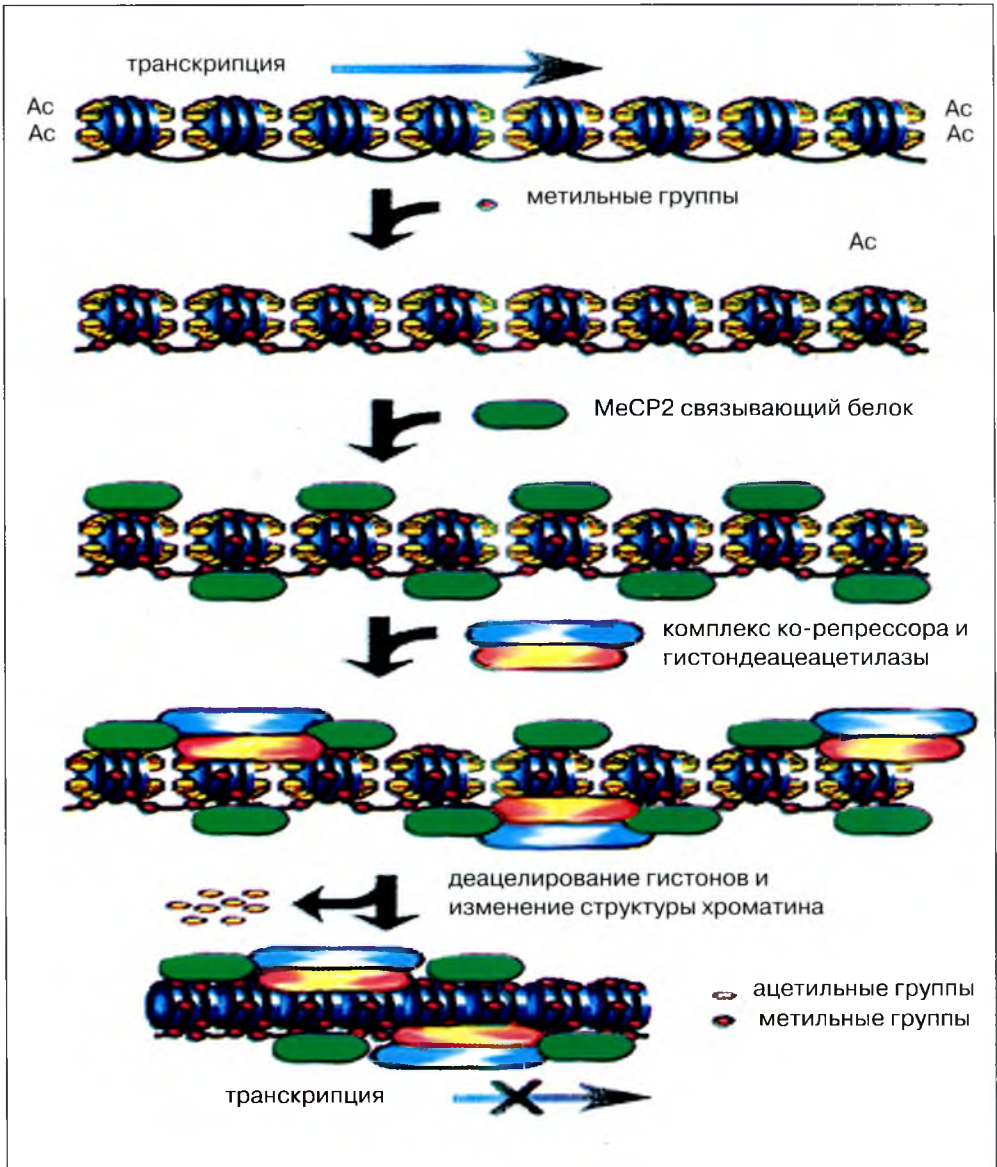
**Рис. 65.** Анализ состава сверхчисленной маркерной хромосомы методом создания специфичной ДНК-клонотеки и «обратной» FISH

а – GTG-окрашенные метафазные хромосомы; б – сбор материала аномальной хромосомы; в – фиксация материала аномальной хромосомы на оттянутом кончике стеклянной иглы; г – этапы переноса материала аномальной хромосомы в раствор для выделения ДНК; д – FISH WCP аномальной хромосомы с метафазными хромосомами пациента



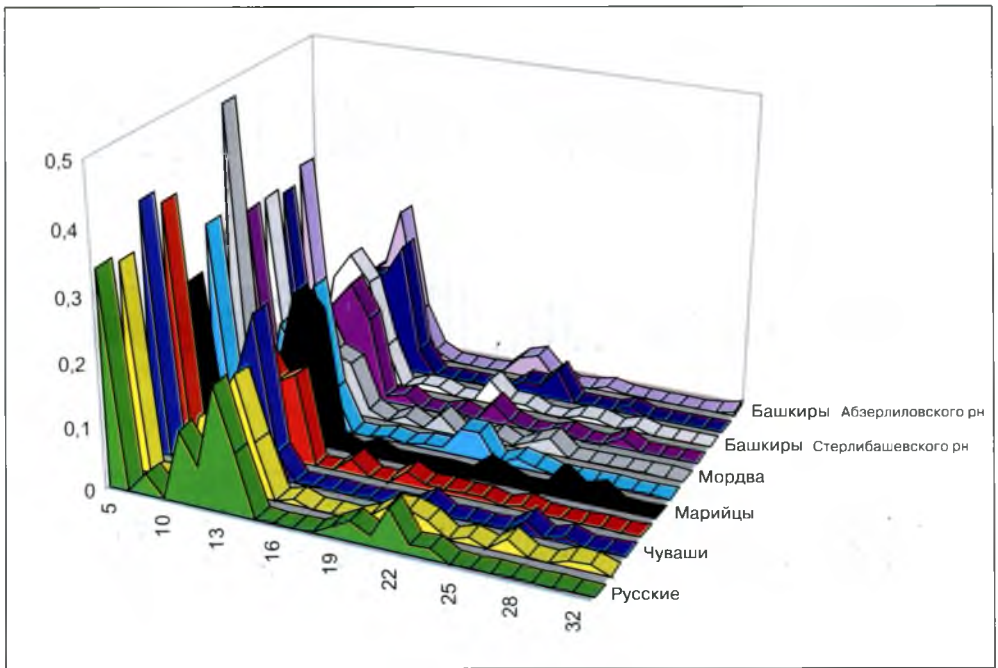
**Рис. 66.** Анализ аномальной хромосомы 3p+

а – GTG-дифференциальная окраска хромосомы 3 и хромосомы 3p+ пациента; б – идиограмма хромосомы 10, GTG-окраска хромосомы 10, FISH WCP10 (окрашивание DAPI), FISH WCP аномальной хромосомы с хромосомой 10 (стрелкой указана точка разрыва); в – идиограмма аномальной хромосомы 3p+

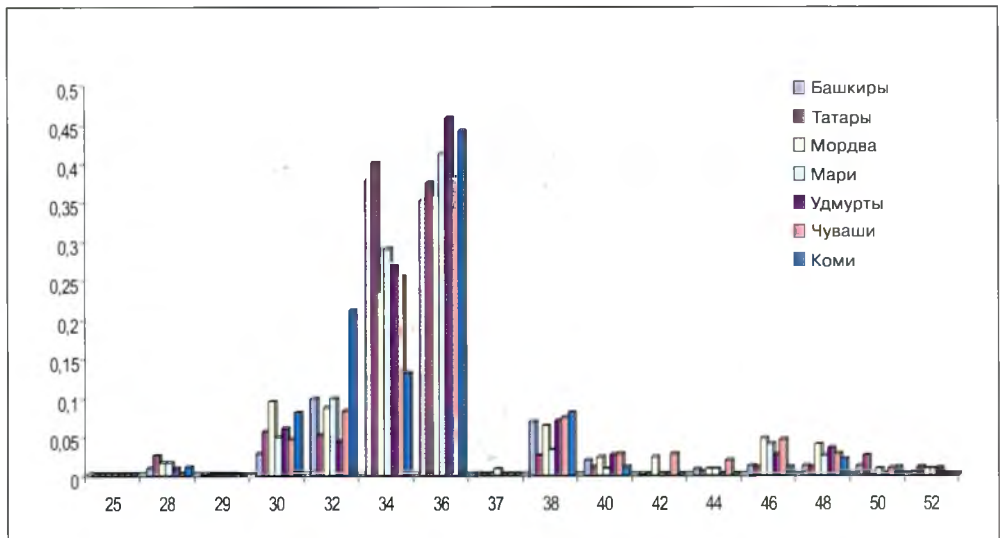


**Рис. 75.** Влияние метилирования ДНК на структуру хроматина





**Рис. 80.** Распределение частот СТG-повторов в популяциях Волго-Уральского региона



**Рис. 81.** Распределение частот аллелей гипервариабельного локуса *Arov* в популяциях народов Волго-Уральского региона. (По оси абсцисс – число гипервариабельных элементов, по оси ординат – частоты аллелей)

хромосомы 11, FISH с этими ДНК-пробами дает совмещенные сигналы. В клетке, несущей  $t(11;?)(q23;?)$ , выявляется один сайт совмещенных сигналов (нормальная хромосома) и два сигнала разного цвета, отстоящих друг от друга на некотором расстоянии. В случае делеции части MLL выявляется один двухцветный и один из разделенных сигналов.

Пожалуй, самой известной хромосомной перестройкой, выявленной при онкологических заболеваниях, является  $t(9;22)(q34;q11.2)$  — филадельфийская хромосома. С ней связано формирование гибридных генов *ABL* (хромосома 9) и *BCR* (хромосома 22). Большинство точек разрывов в гене *BCR* происходит внутри локуса (*M-bcr*) размером 5,8 т.п.н. хромосомы 22. Реже точки разрывов выявляются несколько ближе к центromере в районе *m-bcr* внутри первого интрона гена *BCR*. Точки разрывов в гене *ABL* приходятся преимущественно на участок в 200 т.п.н., расположенный в районе 5'-конца экзона 2 гена *ABL*. Для выявления  $t(9;22)$  эффективно использование следующего комплекта ДНК-проб: ДНК-проба размером около 650 т.п.н., покрывающая район от проксимального конца гена *ASS* (ген, кодирующий аргининсукцинатсинтазу) до дистального конца гена *ABL*, меченная одним флуорохромом, и две ДНК-пробы, меченные другим флуорохромом, одна из них (около 600 т.п.н.) соответствует району, включающему гены *IGLV*, *BCR* и участок ДНК между ними; вторая проба покрывает участок 22 хромосомы размером около 600 т.п.н., который начинается в 300 т.п.н. от 3'-конца гена *BCR*. Можно сказать, что вторая проба покрывает отрезок ДНК размером около 1,5 м.п.н. в локусе 22q11.2, из которого удален фрагмент (~300 т.п.н.), содержащий низкокопийные повторенные последовательности ДНК (см. вкл. рис. 61).

Гибридизация этих ДНК-проб с интерфазными ядрами, содержащими интактные хромосомы, дает две пары зон одноцветных сигналов. При наличии сбалансированной транслокации  $t(9;22)$  выявляется два одноцветных сигнала разного цвета и две зоны двухцветных сигналов. В случае транслокаций, сопровождающихся делециями, выявляется только один двухцветный сигнал и три одноцветных ( $2+1$  или  $1+2$ ), что позволяет определить, делеция района какой из хромосом имела место.

Мы не будем детально рассматривать все возможные случаи определения хромосомных перестроек с помощью FISH, а приведем несколько примеров хромосомных перестроек, выявление которых имеет диагностическое и прогностическое значение: транслокация  $t(15;17)(q22;q21.1)$ , делеции локуса *EGR1* — 5q31, делеция 5(q33;q34), делеции 7q31, изохромосома  $i(7)(q10)$ , делеции 20q12, транслокация  $t(12;21)(p13;q22)$ , делеции в районе 9p21, транслокации  $t(8;22)(q24;q11)$ ,  $t(2;8)(p11;q24)$ ,  $t(8;14)(q24;q32)$ , делеции в районах 13q14.3 и 17p13.1.

Описанный подход к анализу хромосомных патологий методом гибридизации *in situ* специально разработанных для этих целей ДНК-проб с интерфазными ядрами применим и при проведении диагностики в случае солидных опухолей.

Рассматривая ДНК-пробы, специфичные определенным локусам хромосом, нельзя не упомянуть набор ДНК-проб, созданных для идентификации теломерных районов. В настоящее время коммерчески доступны ДНК-пробы, специфичные теломерным районам всех хромосом человека. FISH с этими ДНК-пробами позволяет определить происхождение теломерного района и дает ценную информацию об организации аномальной хромосомы.

## Методы общего анализа индивидуальных хромосом

### *Многоцветное окрашивание хромосом человека (multi color banding – MCB)*

Метод MCB предназначен для детального анализа отдельных хромосом. В его основе лежит использование микродиссекционных районспецифичных ДНК-клонотек, многоцветной FISH, цифровой видеозаписи микроизображений и их специализированной компьютерной обработки. Цифровая запись микроизображений и компьютерная обработка позволяют перевести в псевдоцвета не только комбинации флуорохромов, но и соотношения их интенсивностей. Данная система была разработана сотрудниками Института генетики человека Университета г. Йены, Германия (проф. Уве Клауссен, доктор Ильза Худоба) в сотрудничестве с фирмой MetaSystems [Chudoba et al., 1999a,b]. В 2001 г. эти исследователи в сотрудничестве с Институтом цитологии и генетики СО РАН создали комплекты ДНК-клонотек для всех хромосом человека [Liehr et al., 2001]. Комплект ДНК-проб для индивидуальной хромосомы представляет собой набор микродиссекционных ДНК-клонотек, каждая из которых обеспечивает необходимый профиль интенсивности сигнала в пределах соответствующего хромосомного района. Уровень сигнала каждой из микродиссекционных районспецифических ДНК-клонотек варьирует по интенсивности, достигая максимума в центре и постепенно падая практически до нуля на его границах. Мечение ДНК-клонотек флуорохромами проводится таким образом, чтобы после FISH не возникало одинаковых комбинаций флуорохромов в разных хромосомных районах. Перекрывание профилей интенсивности сигналов ДНК-проб обеспечивает вариации соотношений интенсивностей флуоресценции различных флуорохромов вдоль хромосомы. В результате программной обработки изображения каждому из хромосомных районов, характеризующихся уникальной комбинацией сигналов разных флуорохромов, присваивается свой псевдоцвет (см. вкл. рис. 62). Программное обеспечение, необходимое для обработки микроизображений и генерации MCB, входит в пакеты программ фирмы MetaSystems GmbH.

Метод MCB дает идентичный паттерн цветов на хромосомах различного уровня конденсации, что обеспечивает высокий уровень разрешения даже при анализе высококонденсированных хромосом и хромосом с нечеткой морфологией, характерных для цитологических препаратов малигнизированных клеток. При анализе аномальных хромосом, содержащих участок анализируемой хромосомы, возможно определение его локализации, а в случае достаточного размера и его ориентации (см. вкл. рис. 63). При анализе маркерной хромосомы, состоящей из участка анализируемой хромосомы, MCB, в отличие от традиционных методов M-FISH, позволяет провести идентификацию хромосомных районов, формирующих маркерную хромосому (см. вкл. рис. 64).

MCB открывает принципиальную возможность проведения полного анализа индивидуальной хромосомы в интерфазном ядре, но в настоящее время еще остается ряд нерешенных технических вопросов, которые не позволяют использовать MCB в рамках рутинной цитогенетики интерфазных ядер [Claussen et al., 2002].

## Микродиссекция метафазных хромосом и «обратная» FISH

Мощным инструментом анализа аномальных хромосом оказался комплекс методов получения ДНК-клонотеки аномальной хромосомы, создания на ее базе ДНК-проб и проведения FISH этих ДНК-проб с нормальными хромосомами человека. Совершенствование техники микродиссекции метафазных хромосом и методов амплификации ДНК собранного материала сделало возможным получение WCP аномальной хромосомы из одной ее копии (см. вкл. рис. 65), а также последовательную диссекцию хромосомных районов аномальной хромосомы для создания их ДНК-проб.

Такой подход оказался высокоэффективным при анализе малых сверхчисленных маркерных хромосом, делеций, а также аномальных хромосом, возникших в результате сложных хромосомных перестроек. Одним из достоинств метода является возможность определения точек разрывов, имевших место при реорганизации хромосом, с максимальным для цитологического анализа разрешением. К сожалению, данный комплекс методов не относится к простым и легко воспроизводимым. Он требует от исследователя опыта цитогенетических, микроманипуляционных и молекулярно-генетических работ. В настоящее время существует несколько центров, проводящих анализ хромосомных перестроек методом микродиссекции и «обратной» FISH полученных ДНК-проб (цитогенетическая лаборатория в Майнце, Институт генетики человека в Йене, Германия; Институт цитологии и генетики СО РАН в Новосибирске, РФ) [Mueller-Navia et al., 1995; Rubtsov et al., 1996; Рубцов и др., 2001].

## 6.4. ПРАКТИКА МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

В России осуществлена концентрация средств для проведения исследований, связанных с анализом сложных хромосомных перестроек. Основные ресурсы сосредоточены в федеральных медико-генетических центрах, находящихся в Москве, Санкт-Петербурге и Томске [Варанов, 1999]. Все они созданы на базе институтов, непосредственно связанных с решением проблем клинической и фундаментальной медицинской генетики. В настоящее время деятельность федеральных центров направлена, главным образом, на молекулярную диагностику наследственных заболеваний, идентификацию мутаций, исследования полиморфизма генов, связанных с развитием наследственных заболеваний, а также на детальный анализ сложных хромосомных перестроек. В рамках российской программы по картированию генома человека была создана оригинальная коллекция клонированных ДНК-последовательностей, которая может быть эффективно использована совместно с коммерчески доступными ДНК-пробами. В федеральных центрах для проведения постнатальной и пренатальной молекулярно-цитогенетической диагностики используются WCP, а также ДНК-пробы, которые выявляют определенные районы хромосом [Варанов, 1999]. Разворачива-

ются работы по использованию методов сравнительной геномной гибридизации. Для повышения эффективности проведения FISH с отдельными WCP в Томском федеральном центре [Назаренко и др., 1998] была разработана система определения оптимальной последовательности использования ДНК-проб, основанная на анализе морфо-функциональных нарушений, обнаруженных у пациента. Это позволило сократить среднее число экспериментов, необходимых для определения хромосомной принадлежности маркерной хромосомы в среднем до 6,4.

Альтернативный подход к диагностике хромосомных патологий человека используется в Институте цитологии и генетики СО РАН [Rubtsov et al., 1996; Рубцов и др., 2001]. Он заключается в создании WCP аномальных хромосом с последующим изучением их состава путем проведения FISH с метафазными хромосомами здоровых доноров. Ниже мы представляем результаты подобного анализа кариотипа пациентов Новосибирского областного диагностического центра, муниципального центра планирования семьи и репродукции г. Новосибирска и Новосибирской государственной медицинской академии в случаях, когда методы дифференциального окрашивания хромосом оказывались бессильны, либо не давали надежного результата.

Стандартная схема проведения молекулярно-цитогенетического анализа аномальной хромосомы включала следующие этапы:

- 1) идентификация аномальной хромосомы методом GTG-окрашивания;
- 2) создание WCP аномальной хромосомы микроманипуляционным сбором аномальных хромосом и последующей ПЦП с частично вырожденными праймерами (DOP-PCR – degenerative oligonucleotide primer-PCR);
- 3) контроль специфичности WCP аномальной хромосомы CISS-гибридизацией с метафазными хромосомами пациента;
- 4) идентификация материала аномальной хромосомы CISS-гибридизацией WCP с метафазными хромосомами здорового донора.

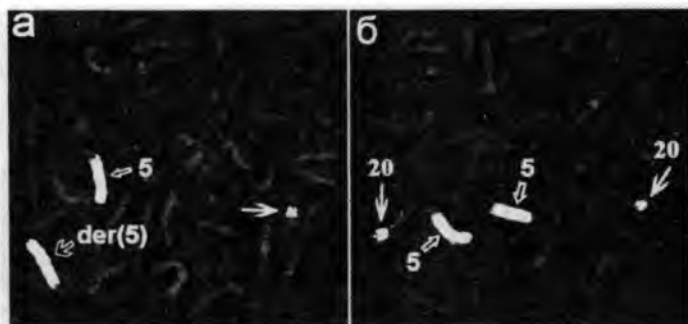
Ниже приведены примеры анализа различных типов хромосомных патологий.

## **Анализ несбалансированных хромосомных транслокаций**

Анализ GTG-окрашенных хромосом пациента выявил наличие аномальной хромосомы: 3p+ (см. вкл. рис. 66). В результате цитогенетического обследования у родителей и сестры пациента хромосомной патологии не выявлено. Для идентификации материала аномальной хромосомы была создана ее WCP. Проведена FISH полученной WCP с хромосомами пациента и нормального донора (рис. 66). Установлено, что аномальная хромосома является  $der(3)t(3;10)(3p25;q24.3)$ .

## **Анализ сбалансированных хромосомных транслокаций**

В результате анализа GTG-окрашенных хромосом пациента была выявлена транслокация  $t(5;20)$ . Для уточнения точек разрывов при формировании транслокации была получена WCP  $der(5)t(5;20)$  и проведена FISH с хромосомами пациента и нормального донора (рис. 67). Кариотип пациента был описан как  $46,XY,t(5;20)(q31.1;q11.2)$ .



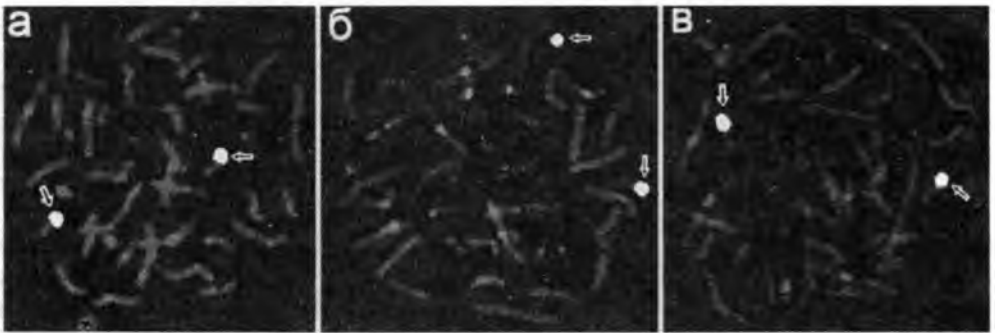
**Рис. 67.** Анализ транслокации  $t(5;20)$

CISS-гибридизация WCP  $der(5)t(5;20)$  с метафазными хромосомами пациента (а) и здорового донора (б)

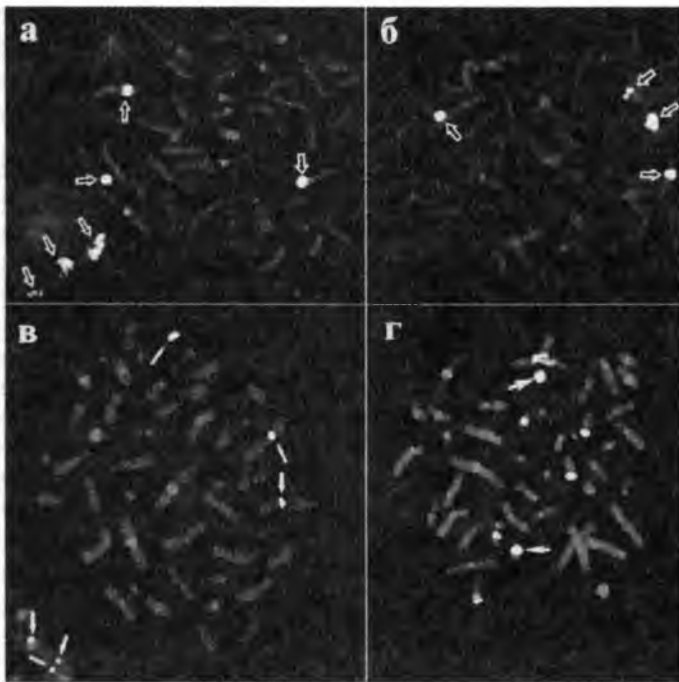
## Анализ малых сверхчисленных маркерных хромосом

Морфология сверхчисленной маркерной хромосомы одного из пациентов Новосибирского областного диагностического центра (маленькая метацентричная хромосома, кариотип пациента по результатам рутинной цитогенетической диагностики:  $47,XX,+mar$ ), а также выявленные у него нарушения развития совпадали с описанными ранее случаями  $47,XX,+i(18)(p10)$ . Для идентификации материала, входящего в состав маркерной хромосомы, была получена ее WCP и проведена CISS-гибридизация с хромосомами пациента и здорового донора (рис. 68). Полученные результаты наглядно демонстрируют, что маркерная хромосома состоит из материала р-плеча хромосомы 18. Для более точного описания маркерной хромосомы нами были получены индивидуальные ДНК-клонотеки каждого из ее плеч. Так как цитологически эти плечи были неотличимы, ДНК-пробы создавались следующим образом: микроманипуляционно собирали одно плечо хромосомы, и его материал использовали для создания ДНК-пробы. Оставшуюся часть хромосомы (второе плечо) использовали для создания второй ДНК-пробы. Таким образом, последовательной микродиссекцией одной копии хромосомы были получены ДНК-пробы ее плеч. CISS-гибридизация этих ДНК-проб с нормальными хромосомами показала, что оба плеча маркерной хромосомы представляют собой  $18pter \rightarrow p10$ , а маркерная хромосома, действительно, является  $i(18)(p10)$ . Кариотип пациента был описан как  $47,XX,+i(18)(p10)$ . Насколько нам известно, проведенное нами исследование хромосомы  $i(18)(p10)$  является первым примером последовательной диссекции аномальной хромосомы для детального описания ее организации. Эффективность данного подхода была подтверждена нами при проведении аналогичного анализа хромосомы  $i(21)(q10)$  у пациента с кариотипом  $46,XY,+i(21)(q10)$ . В этом случае также была проведена последовательная диссекция одной копии аномальной хромосомы, которая позволила показать, что оба плеча хромосомы  $i(21)(q10)$  представляют собой интактные q-плечи хромосомы 21.

Получение WCP аномальной хромосомы с последующей CISS-гибридизацией с нормальными метафазными хромосомами в настоящее время является прямым и наиболее эффективным способом определения не только хромосомной принадлежности материала маркерной хромосомы, но и границ хромосомных районов, входящих в ее состав. Дополнительной демонстрацией этого может слу-



**Рис. 68.** Анализ сверхчисленной метацентрической маркерной хромосомы  
 а – CISS-гибридизация WCP маркерной хромосомы с метафазными хромосомами здорового донора;  
 б, в – CISS-гибридизация ДНК-проб отдельных плеч маркерной хромосомы с метафазными хромосомами здорового донора. Стрелками указаны сигналы в коротком плече хромосомы 18



**Рис. 69.** Анализ сверхчисленных маркерных хромосом  
 CISS-гибридизация ДНК-клонотек маркерной хромосомы, состоящей из 4p11@q11 (а), и маркерной хромосомы, состоящей из Xp11@q11 (б), с метафазными хромосомами пациентов и здоровых доноров  
 Стрелки указывают на районы локализации ДНК, гомологичной ДНК маркерных хромосом, на метафазных хромосомах и в интерфазных ядрах пациентов (а–в). Линии обозначают точки разрыва в районах 22pter>q11.2 (г)

жить проведенный анализ материала других маркерных хромосом, обнаруженных при рутинной цитогенетической диагностике в медико-генетических учреждениях Новосибирска (рис. 69). Следует отметить, что полученные в ходе исследований молекулярно-цитогенетической диагностики малых сверхчисленных хромосом ДНК-пробы прицентромерных районов хромосом 2, 4, X могут быть использованы в дальнейшем для анализа хромосомного мозаицизма в различных тканях пациента методами интерфазной цитогенетики (рис. 69).

Ряд проблем при определении состава маркерных хромосом возникает в случае присутствия в этой хромосоме материала спутников и районов С-гетерохроматина хромосом 13-15, 21 и 22. Эти районы имеют много гомологичных последовательностей. В результате ДНК-проба такой аномальной хромосомы окрашивает спутники и частично С-блоки этих хромосом (рис. 69). Маркерная хромосома, присутствующая в клетках пациента, была идентифицирована нами как  $del(22)(q11.2)$ , благодаря присутствию в ее составе небольшой части эухроматинового района  $22q11.2$ . Однако определение в составе маркерной хромосомы именно эухроматинового района имеет важное значение для медико-генетической диагностики. Использование для определения происхождения этой маркерной хромосомы стандартного зонда CEP22 («нумератора» хромосомы 22) не позволило бы получить эту информацию.

## Анализ делеций хромосомных районов

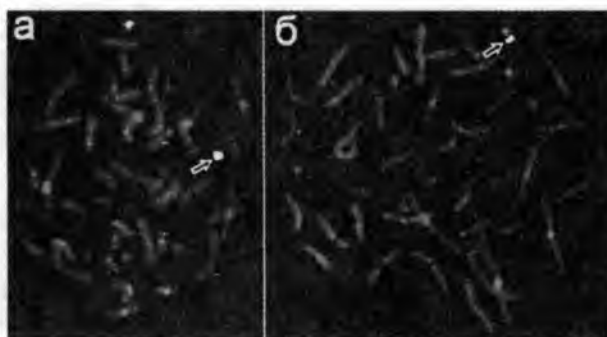
Получение ДНК-клонотек аномальных хромосом значительно расширяет возможности проведения цитогенетического анализа хромосом с делецией различных районов. Как было показано ранее, такой подход позволяет, с одной стороны, с высоким уровнем разрешения локализовать точки разрывов, приведших к потере хромосомного района, а с другой стороны — обеспечивает возможность оценки хромосомного полиморфизма [Rubtsov et al., 1996]. Выполненное ранее исследование, посвященное выявлению и локализации делеции в q-плече хромосомы 6, показало потерю района ( $q25.1 \rightarrow q27$ ) в одном из гомологов хромосомы 6 во всех исследованных клетках крови, в то время как на основании результатов рутинной цитогенетической диагностики предполагалось присутствие аномальной хромосомы 6 в 10–30% клеток.

Другим примером использования стандартного протокола хромосомного анализа является детальное описание  $der(Y)$  у пациента, кариотип которого первоначально был описан как  $mos\ 46,X,+mar[85]/45,X[15]$ . Учитывая фенотип пациента, уже на этом этапе было высказано предположение, что маркерная хромосома представляет собой кольцевую хромосому  $r(Y)$ . Результаты молекулярно-цитогенетического анализа (рис. 70) позволили описать его кариотип как  $mos\ 46,X,+r(Y)(p11.2;q10)[85]/45,X[15]$ .

## Анализ сложносоставных маркерных хромосом

Цитогенетический анализ GTG-дифференциально окрашенных хромосом выявил в клетках костного мозга пациента хромосомные перестройки, затрагивающие хромосомы 1 и 2, которые привели к формированию двух крупных маркерных хромосом. Для идентификации материала этих маркерных хромосом были созданы их WCP, специфичность которых была проверена CISS-гибридизацией с





**Рис. 70.** Анализ аномальной хромосомы у пациента с кариотипом 46,X,+mar[85]/45,X[15] CISS-гибридизация WCP аномальной хромосомы с метафазными хромосомами пациента (а) и здорового донора (б). Стрелки указывают на сигнал на маркерной хромосоме (а) и в районе Yp11.2@q10 Y-хромосомы здорового донора

метафазными хромосомами пациента. Сигнал был выявлен на маркерных хромосомах и в хромосомных районах, содержащих ДНК, гомологичную ДНК маркерных хромосом (рис. 71). При проведении CISS-гибридизации WCP первой маркерной хромосомы (mar1) с метафазными хромосомами здорового донора сигнал был выявлен в пяти хромосомных районах: 2q12→q37.2, 5q11.2→q14, 8q24.2→qter, 18p11.2→q21, 20q13.2→qter. CISS-гибридизация WCP второй маркерной хромосомы (mar2) выявила сигнал в районах 1q11→qter, 5q11.1, 5q15, 8p23→q12 и 20pter→p11.2. Заметим также, что результаты проведенного исследования показали клональную природу всех трансформированных клеток. Присутствие идентичных маркерных хромосом во всех исследованных клетках свидетельствует о происхождении бластов из одной претерпевшей трансформацию плюрипотентной клетки.

Для определения порядка расположения хромосомных районов и их ориентации совместно с коллегами из Института генетики человека Йенского университета (Германия) соответствующие хромосомы были исследованы методами 24-цветной FISH и MCB (см. вкл. рис. 63). В результате маркерная хромосома 1 была описана как:

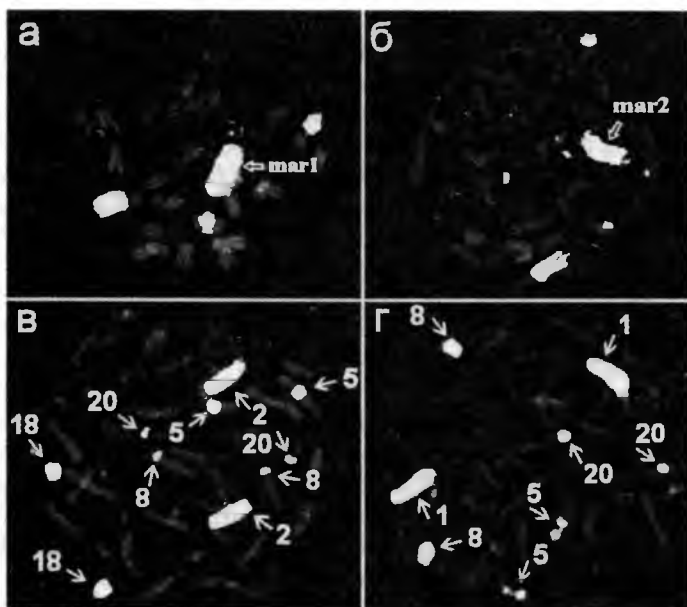
der(18)t(8;18;5;2;20)(8qter→q24.2::18p11.2→q21.2::5q11.2q→21.2::2q37.2→q12::20q13.2→qter),

маркерная хромосома 2 была описана как

der(8)t(20;8;5;5;1)(20pter→p11.2::8p23→q11.2::5q11.1::5q15::1q11→qter) или  
der(8)t(20;8;5;5;1)(20pter→p11.2::8p23→q11.2::5q15::5q11.1::1q11→qter).

Комбинированное использование методов микродиссекции метафазных хромосом 24-цветной FISH и MCB впервые позволило дать столь подробное описание подобных сложноорганизованных маркерных хромосом.

Следует отметить, что из 16 точек разрыва, обнаруженных при анализе mar1 и mar2, 11 ранее уже выявлялись при хромосомном анализе ОМЛ [Mitelman, 1997].



**Рис. 71.** Анализ маркерных хромосом 1 и 2 больного острым миелоидным лейкозом. CISS-гибридизация ДНК-клонотек маркерных хромосом 1 (а, в) и 2 (б, г) с метафазными хромосомами пациента (а, б) и здорового донора (в, г). Стрелками указаны соответствующие хромосомы

## Особые случаи анализа хромосомных аномалий

Значительные преимущества в проведении цитогенетического анализа микродиссекция аномальных хромосом дает при отсутствии на цитологическом препарате метафазных хромосом высокого или хотя бы удовлетворительного качества. Это относится к большинству случаев гематологических и других онкологических заболеваний. С подобными проблемами мы встречались и при проведении нормальной постнатальной диагностики. Крайне низкое качество препаратов в этих случаях было обусловлено длительностью (несколько дней) транспорта образцов крови из районов Крайнего Севера. На стандартном цитологическом препарате присутствовало две-три метафазные пластинки очень низкого качества. ДНК-клонотеки в этих случаях готовились из одной копии подозрительной хромосомы, но проведение CISS-гибридизации полученных WCP с прометафазными хромосомами здоровых доноров позволило провести детальное описание аномальных хромосом на высоком уровне разрешения.

## Производство хромосомо-, плече- и районспецифических ДНК-проб

Для контроля результатов хромосомной диагностики и проведения 24-цветной FISH нами были получены ДНК-пробы всех хромосом человека. Совместно с коллегами из Института генетики человека Йенского университета были разра-

ботаны наборы районспецифичных ДНК-проб для многоцветного окрашивания всех хромосом человека. Использование микродиссекции нормальных хромосом для создания плече- и районспецифических ДНК-проб имеет один недостаток. Диссекция хромосомы не может быть осуществлена идеально по центральному району. Эта проблема может быть решена созданием WCP изохромосом. В настоящее время таким образом были получены ДНК-пробы короткого плеча хромосомы 18 (см. рис. 68), длинных плеч хромосомы 21 и X-хромосомы.

## **Сравнение микродиссекционной технологии с другими методами молекулярно-цитогенетического анализа хромосомных патологий человека**

В течение нескольких лет мы использовали микроманипуляционную технологию для детального анализа аномальных хромосом, выявленных у пациентов медицинских и научно-исследовательских учреждений Новосибирска. Результаты идентификации материала малых сверхчисленных хромосом, хромосомных транслокаций, делеций, маркерных хромосом, обнаруженных при гематологических заболеваниях, показали ее высокую эффективность.

В сравнении с другими методами цитогенетического анализа создание WCP аномальной хромосомы с последующей CISS-гибридизацией имеет ряд преимуществ. В результате FISH одной ДНК-пробы, специфичной целой аномальной хромосоме, исследователь получает полную информацию не только о хромосомной принадлежности ее материала, но и точное описание входящих в ее состав хромосомных районов. Рутинное использование WCP нормальных хромосом, с одной стороны, требует проведения значительного числа экспериментов, а с другой — не дает информации о том, какие именно районы хромосомы входят в состав аномальной. Кроме того, микродиссекция хромосом с последующей DOP-PCR позволяет при необходимости создать любую хромосомо- или районспецифичную ДНК-пробу. Практика хромосомной диагностики, использующая технологию микродиссекции хромосом, показала высокую эффективность этого подхода.

## **Литература**

Доклад научной группы ВОЗ. Борьба с наследственными болезнями // Женева. 1997. С. 1–129.

Назаренко С.А., Островерхова Н.В., Пузырёв В.П. и др. Идентификация маркерных хромосом и транслокаций человека с помощью компьютерной диагностической базы данных и флуоресцентной гибридизации *in situ* // Генетика. 1998. Т. 34, № 1. С. 114–122.

Рубцов Н.Б., Карамышева Т.В. Цитогенетическая диагностика онкологических заболеваний // Клиническая онкология и гематология. 2000. Т. 2. С. 7–21.

Рубцов Н.Б., Карамышева Т.В., Матвеева В.Г. и др. Обратная *in situ* гибридизация ДНК-зондов аномальных хромосом в диагностике хромосомных патологий // Генетика. 2001. Т. 37, № 10. С. 1–8.

*Baranov V.S.* Peculiarities of organisation and present state of prenatal diagnosis service in Russia // *E.C.A. News Letter*. 1999. № 3. P. 9–10.

*Chudoba I., Rubtsov N., Senger G.* et al. Improved detection of chromosome 16 rearrangements in acute myeloid leukemias using 16p and 16q specific microdissection DNA libraries // *Oncology reports*. 1996. № 3. P. 829–832.

*Chudoba I., Plesch A., Loerch T.* et al. High resolution multicolor-banding: a new technique for refined FISH analysis of human chromosomes // *Cytogenet. Cell Genet*. 1999a. Vol. 84. P. 156–160.

*Chudoba I., Senger G., Plesch A., Claussen U.* New developments in clinical cytogenetics // *E.C.A.S. News Letter*. 1999b. № 3. P. 3–6.

DGS. SKYtm vs. M-FISH comparison // *Rev* 13. 1998. Nov. P. 1/8–8/8.

*Drumheller T., McGillivray B.C., Behrner D.* Precise localisation of 3p25 breakpoints in four patients with the 3p-syndrome // *J. Med. Genet*. 1996. Oct. 33. Vol. 10. P. 842–847.

*Du Manoir S., Speicher M.R., Joos S.* et al. Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic hybridization // *Hum. Genet*. 1993. Vol. 90. P. 590–610.

*Ghaddar H.M., Pierce S., Reed P., Estey E.H.* Prognostic value of residual normal metaphases in acute myelogenous leukemia patients presenting with abnormal karyotype // *Leukemia*. 1995. Vol. 9. P. 779–782.

*Knight L.A., Yong M.H., Tan M., Ng I.S.* Del(3)(p25.3) without phenotypic effect // *J. Mol. Genet*. 1995. Dec 32. Vol. 12. P. 994–995.

*Beheshti B., Park P.C., Braude I., Squire J.A.* Microarray CGH. Methods in Molecular Biology. V.204. Molecular Cytogenetics. Protocols and Applications /Ed. Yao-Shan Fan. London Health Sciences Center and the University of Western Ontario, London, Ontario, Canada. 2002. P. 191–207.

*Lemke J., Claussen J., Michel S.* et al. The DNA-Based Structure of Human Chromosome 5 in Interphase // *Am. J. Hum. Genet*. 2002. Vol. 71. P. 1051–1059.

*Lichter P., Cremer T., Borden J.* et al. Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by *in situ* suppression hybridization using recombinant DNA libraries // *Hum. Genet*. 1988. Vol. 80. P. 224–234.

*Liehr T., Heller A., Starke H.* et al. Microdissection based high resolution multicolor banding for all 24 human chromosomes // *International Journal of molecular medicine*. 2002. Vol. 9. P. 335–339.

*Macville M., Schroeck E., Padilla-Nash H.* et al. Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa cells by spectral karyotyping // *Cancer Res*. 1999. Vol. 59. P. 141–150.

*Marlton P., Keating M., Kantarjian H.* et al. Cytogenetic and clinical correlates in AML patients with abnormalities of chromosome 16 // *Leukemia*. 1995. Vol. 9. P. 965–971.

*Mitelman F., Mertens F., Johansson B.* A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia // *Nature Genet.* (Special issue). 1997. P. 415–474.

*Mueller S., Rocchi M., Ferguson-Smith M., Wienberg J.* Toward a multicolor chromosome bar code for the entire human karyotype by fluorescence *in situ* hybridization // *Hum. Genet*. 1997. Vol. 100. P. 271–278.

*Mueller S., O'Brien P.C., Ferguson-Smith M.A., Wienberg J.* Cross-species colour segmenting: a novel tool in human karyotype analysis // *Cytometry*. 1998. Vol. 33. P. 445–452.

*Mueller-Navia J., Nebel A., Schleiermacher E.* Complete and precise characterization of marker chromosomes by amplification of microdissection in prenatal diagnosis // *Hum. Genet.* 1995. Vol. 96. P. 661–667.

*Philipps M.E., Latif F., Prowse A.* et al. Molecular genetic analysis of the 3p-syndrome // *Hum. Mol. Genet.* 1994. № 6. P. 903–908.

*Piper J., Rutovitz D., Sudar D.* et al. Computer image analysis of comparative genomic hybridization // *Cytometry.* 1995. Vol. 19. P. 10–26.

*Shapiro B.L.* The Down syndrome critical region // *J. Neural Transm. Suppl.* 1999. Vol. 57. P. 41–60.

*Rowley J.D., Aster J.C., Sklar J.* The clinical applications of new DNA diagnostic technology on the management of cancer patients // *JAMA.* 1993. Vol. 270. P. 2331–2337.

*Rubtsov N., Senger G., Kucera H.* et al. Interstitial deletion of chromosome 6q: report of a case and precise definition of the breakpoints by microdissection and reverse painting // *Hum. Genet.* 1996. Vol. 97. P. 705–709.

*Schroeck E., Manoir S., Veldman T.* et al. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes // *Science.* 1996. Vol. 273. P. 494–497.

*Schroeck E., Padilla-Nash H.* Spectral karyotyping and multicolor fluorescence in situ hybridization reveal new tumor-specific chromosomal aberrations // *Semin. Hematol.* 2000. Vol. 37. № 4. P. 334–347.

*Solinas-Toldo S., Lengauer C., Fries R.* Comparative genome map of human and cattle // *Genomics.* Vol. 27. P. 489–496.

*Speicher M.R., Ballard S.G., Ward D.C.* Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH // *Nature Genet.* 1996. Vol. 12. P. 368–375.

*Verma R.S., Babu A.* Human chromosomes. Principles and techniques // New York. 1994. P. 72–172.

*Voullaire L., Wilton L., Stater H., Williamson R.* Detection of aneuploidy in single cells using comparative genomic hybridization // *Prenat. Diagn.* 1999. Vol. 19. P. 846–851.

*Voullaire L., Slater H., Williamson R., Wilton L.* Chromosome analysis of blastomers from human embryos by using comparative genomic hybridization // *Hum. Genet.* 2000. Vol. 106. P. 210–217.

# Онкогеномика и молекулярная диагностика в онкологии

*Д.В. Залетаев, В.Н. Горбунова, О.В. Бабенко*

## **ВВЕДЕНИЕ**

Исследование молекулярно-биологических причин возникновения рака остается актуальной проблемой. Практически нет семьи, которая не столкнулась бы с той или иной формой заболевания. В последние десятилетия частота онкологических заболеваний неуклонно растет. Частота ретинобластомы за последние 30 лет возросла почти в три раза и составляет 1 на 10 000–15000, нефробластома и нейробластома имеют частоту 1 на 8000–10 000, частота карциномы почек ежегодно увеличивается на 2%, частота меланомы увеличилась за 60 лет почти в 20 раз, частота рака молочной железы увеличивается каждый год на 1,2%. Частота злокачественных опухолей щитовидной железы резко выросла в районах, подвергшихся радиоактивному заражению в результате аварии на ЧАЭС. Неуклонно возрастает частота рака легкого, яичников, желудочно-кишечного тракта и др., причем опухоли все чаще возникают в молодом и среднем возрасте. Причинами являются и неблагоприятная экологическая обстановка, и образ жизни, и генетические факторы. Факт, что рак является генетическим заболеванием, уже не вызывает сомнений. Целый ряд фундаментальных фактов свидетельствует о ключевой роли повреждений молекул ДНК в развитии опухолевого процесса. Наиболее значимыми из них являются следующие: 1) наличие большого числа хромосомных перестроек и мутаций генов в опухолевых тканях больных и в культивируемых линиях раковых клеток; 2) существование наследственных форм рака; 3) онкогенное действие ряда вирусов, способных взаимодействовать с геномом клеток хозяина и встраиваться в молекулы ДНК; 4) практически полное совпадение класса химических веществ и физических воздействий, обладающих одновременно мутагенным и канцерогенным эффектами.

Количество картированных и клонированных генов, вовлеченных в канцерогенез, постоянно увеличивается. Однако еще далеко до понимания закономерностей функционирования генома раковой клетки. Дополнительные сложности вносят особенности тканеспецифической регуляции экспрессии генов, которые остаются во многом не выяснены в норме, и многоступенчатость процесса озлокачествления. Поэтому молекулярно-биологические исследования в онкологии являются самостоятельным направлением в геномике человека и на сегодняшний день представляют собой в большей степени фундаментальную проблему, разрешения которой требует клиническая практика.

Для опухоли характерно наличие активно делящихся клеток, не контролируемых внешними тормозящими сигналами. Целый ряд особенностей,

дающих пролиферативные преимущества раковым клеткам, отличают их от нормальных клеток. Это, прежде всего, частичная или полная потеря дифференцировки, иммортализация, способность к росту без прикрепления к субстрату, уменьшение требований к сывороточным ростовым факторам, потеря контактного ингибирования, исчезновение ряда поверхностных макромолекул, делающее клетки менее уязвимыми для действия иммунной системы, и др. Все эти вновь приобретенные свойства раковой клетки находятся под контролем генов. Поэтому первой и важнейшей задачей онкогеномики является определение молекулярных первопричин заболевания, общих закономерностей и механизмов регуляции опухолевого генома. Методы картирования и клонирования новых генов, вовлеченных в канцерогенез, достаточно разнообразны и представляют собой хорошо отработанные технологии. Исследование функций этих генов и путей их взаимной регуляции в опухоли позволяет понять механизмы патогенеза.

Наиболее общим фундаментальным свойством опухолевых клеток следует считать *нестабильность генома*, что проявляется как на хромосомном уровне, так и на уровне отдельных генов. В опухолевых тканях обнаруживается большое количество структурных перестроек, прежде всего транслокаций и делеций, количество которых заметно возрастает по мере прогрессирования злокачественного роста. В не меньшей степени увеличивается число мутационных повреждений в генах, вовлеченных в регуляцию клеточного цикла, происходят аномальная активация и выключение определенных генов. Поэтому второй важнейшей задачей онкогеномики является выявление наиболее характерных нарушений в определенном типе опухоли – создание своеобразного молекулярного портрета генома раковой клетки. Современные методы молекулярной биологии позволяют эффективно проводить комплексный анализ определенного типа опухоли и ДНК-диагностику для конкретного пациента. Специфические молекулярные маркеры или их сочетание позволяют определить прогноз развития заболевания, подобрать оптимальную тактику лечения и разработать новые терапевтические средства. Наибольшее внимание сейчас уделяется разработке методов и подходов к генотерапии онкологических заболеваний. И, наконец, чисто практической задачей онкогеномики является разработка диагностических и лечебных протоколов.

## 7.1. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ КАНЦЕРОГЕНЕЗА

Деление клетки находится под сложным контролем системы позитивных и негативных регуляторов. К позитивным регуляторам роста относятся гены, способные индуцировать деление клетки. Класс негативных регуляторов роста составляют гены, препятствующие делению клетки. В процессе эволюции были выработаны мощные механизмы, направленные на сохранение генетической стабильности и поддержание гомеостаза между действием двух систем регуляции деления клетки. Нарушение этого равновесия является причиной развития патологических процессов, сопровождающих злокачественный рост. К классу позитивных регуляторов относятся *протоонкогены*, значительная часть которых была

идентифицирована по гомологии с вирусными онкогенами. Их канцерогенный эффект может проявиться при наличии активирующей мутации в гетерозиготном состоянии. Позже был открыт класс генов-супрессоров опухолевого роста, иногда называемых *антионкогенами*. Они кодируют белки, относящиеся к системе негативных компонентов регуляции клеточной пролиферации и дифференцировки. Канцерогенный эффект генов-супрессоров может проявиться лишь при наличии гомозиготных повреждений, полностью инактивирующих их функции. В случае мутаций генов, ответственных за репарацию ДНК, потеря способности эффективно восстанавливать нарушенную структуру ДНК может приводить к возникновению мутаций как в онкогенах, так и в генах-супрессорах. Другими словами, в процессе канцерогенеза должно быть нарушено более одного пути регуляции клеточного цикла, чтобы клетка стала злокачественной, т.е. процесс озлокачествления является многошаговым. В одном из исследований было показано 11 тыс. различных изменений в раковой клетке. Тем не менее, в общей сложности, в геноме раковой клетки аномально функционирует не более 5% генов.

## Клеточные онкогены

На сегодняшний день известно немногим более 100 клеточных онкогенов. Их эффект связан либо с производством аномального продукта, обладающего новой агрессивной функцией, либо с нарушением характера экспрессии генов, как правило, с гиперэкспрессией или, реже, с так называемой эктопической экспрессией, т.е. с работой генов в неподходящий момент онтогенетического развития или в несвойственном типе клеток. В общем виде агрессивная функция мутантного продукта онкогена связана с появлением у него способности к передаче сигнала, индуцирующего клетку к делению, в отсутствие внешнего стимула. Подобный аномальный белок может образоваться вследствие возникновения доминантной мутации в онкогене. Такой же активностью может обладать так называемый слитый белок — продукт химерного транскрибируемого гена, образующегося при хромосомных перестройках. Как правило, слияние происходит по интронным областям двух генов в местах разрывов хромосом. Гены могут иметь различные, но относящиеся к регуляции клеточного роста, дифференцировки или пролиферации функции. Очень часто при подобном слиянии изменяется действие белковых продуктов генов или активируются новые транскрипционные факторы.

Гиперэкспрессия онкогенов чаще всего является результатом их избирательной амплификации. Однако подобное состояние, так же как и эктопическая экспрессия, может возникнуть и при нарушении регуляции работы протоонкогенов. Типичным примером является гиперэкспрессия протоонкогенов, которые в результате хромосомной перестройки оказываются в районах генов Т-клеточных рецепторов или генов иммуноглобулинов и попадают под контроль их мощных регуляторных элементов — промоторов. Таким образом, хромосомные перестройки могут приводить к появлению химерных белков с новыми агрессивными функциями и гиперэкспрессии протоонкогенов.

Переход клетки от нормального физиологического состояния к пролиферации, дифференцировке, программированной смерти (апоптозу) или неконтролируемому росту определяется сменой каскада работающих генов. Процесс этот многоступенчатый и может регулироваться на разных этапах клеточного цикла.



Существенную роль в нем играют межклеточные взаимодействия, медиаторами которых служат небольшие пептидные молекулы, называемые *факторами роста*. Любую покоящуюся клетку можно индуцировать к делению, воздействуя на нее факторами роста, взаимодействующими со специфическими трансмембранными рецепторами. Это взаимодействие приводит к возникновению ограниченного спектра биохимических цитоплазматических сигналов, завершающихся активацией одних и репрессией других ядерных транскрипционных факторов, что, в конечном счете, и определяет изменение набора работающих в клетке генов и ее вхождение в нормальный клеточный цикл. При этом клетка не может вернуться к состоянию покоя без завершения хотя бы одного цикла деления. Существуют определенные контрольные точки клеточного цикла, прохождение которых требует одновременного присутствия позитивных и отсутствия негативных регуляторов роста. Если эти условия не соблюдаются, клетка не может перейти на следующую стадию цикла и вступает в апоптоз. Ключевым молекулярным механизмом передачи сигнала является фосфорилирование, поэтому в цепи сигнальной трансдукции участвуют регуляторные белки и вторичные мессенджеры, обладающие киназной активностью. Центральная роль в системе генетического контроля деления клетки принадлежит протоонкогенам.

Для многих генов человека, кодирующих факторы роста, обнаружены гомологи среди вирусных онкогенов и показано, что они сами могут действовать как клеточные онкогены. Типичным примером является ген тромбоцитарного фактора роста *PDGF*.  $\beta$ -цепь этого фактора гомологична белку, кодируемому геном *v-sis* вируса саркомы обезьян. В любых клетках, содержащих рецептор тромбоцитарного фактора роста, наблюдается его постоянная активация при инфицировании вирусом саркомы обезьян вследствие экспрессии большого количества продукта вирусного гена. В опухолевых тканях редко находят мутантные формы генов факторов роста, но часто наблюдается их амплификация, гиперэкспрессия или нарушение тканеспецифичности экспрессии. В ряде неопластических клеток и опухолей обнаруживается присутствие трансформирующего фактора роста ( $TGF\alpha$ ), экспрессирующегося в таком количестве в норме только в эмбриональных тканях. В опухолевых тканях в случае рака молочной железы, желудка и некоторых других органов зарегистрирована гиперэкспрессия генов семейства факторов роста фибробластов *INT2* и *HST*.

Трансмембранные рецепторы факторов роста, осуществляющие перевод внешнего сигнала роста во внутриклеточный, как правило, состоят из трех доменов — внешнего лиганд-связывающего, трансмембранного и цитоплазматического тирозинкиназного домена. Они обладают аутофосфорилирующей способностью, которая появляется вследствие димеризации молекулы при ее взаимодействии с лигандом. Для многих генов рецепторных тирозинкиназ показано, что они могут действовать как онкогены при возникновении в них доминантных мутаций, приводящих к конститутивной активации рецептора в отсутствие лиганда. Хорошо изучен механизм действия мутаций, приводящих к онкогенному фенотипу, в гене рецептора эпидермального фактора роста — *EGFR*, цитоплазматический домен которого имеет 95% гомологию с онкогеном вируса птичьего эритробластоза — *v-erb*. Онкогенный эффект гена *NEU* может быть обусловлен одной миссенс мутацией, приводящей к конститутивной димеризации и активации рецептора тирозинкиназы.

Многие гены, кодирующие белки цитоплазматической трансдукции сигнала роста, также являются протоонкогенами. Среди них можно выделить гены нерецепторных тирозинкиназ, серин-треонинкиназ и G-белков. К нерецепторным тирозинкиназам относится семейство src-белков, идентифицированных впервые как продукт онкогена вируса саркомы Рауса — *v-src*. Эти белки ассоциированы с клеточной мембраной посредством аминотерминального миристилирования (при процессинге белка происходит присоединение остатков миристиловой кислоты с образованием района, специфически взаимодействующего с мембраной клетки). Для членов этого семейства белков характерно наличие двух высококонсервативных некаталитических нуклеотидных последовательностей SH<sub>2</sub> и SH<sub>3</sub>. SH<sub>2</sub>-домен способен связываться с фосфорилированными тирозиновыми остатками, обеспечивая стабильный комплекс между src-киназами и другими сигнальными молекулами, включая рецепторы. Присутствие SH<sub>3</sub>-домена необходимо для взаимодействия src-белков с некоторыми белками цитоскелета и малыми G-белками. В продукте вирусного гена *v-src*, в отличие от продукта клеточного гена, отсутствует тирозин в 527 положении, являющийся важным негативным регулятором киназной активности. Регуляция осуществляется за счет связи этого фосфорилированного остатка с SH<sub>2</sub>-доменом, расположенным выше киназного домена. При этом происходит блокирование взаимодействия между src-киназным доменом и экзогенными субстратами. Дефосфорилирование или мутации в 527 положении белка приводят к постоянной активации киназного домена в отсутствие лигандов.

Представителем другого семейства протоонкогенов, кодирующих нерецепторные тирозинкиназы, является ген *ABL*, гомологичный онкогену вируса мышиной лейкемии Абельсона — *v-abl*. Переход *ABL* к состоянию онкогена достигается либо за счет его слияния с вирусным геном *gag*, как это произошло в *v-abl*, либо за счет его слияния при хромосомной транслокации с геном *BCR*, кодирующим белок с серинкиназной и ГТФазной активностью. Подобная реципрокная транслокация между хромосомами 9 и 22, продукт которой получил название *филадельфийской хромосомы*, присутствует, примерно, у 90% пациентов с хроническим миелолейкозом.

Среди протоонкогенов, кодирующих серин-треонинкиназы, действующие в сигнальном процессе как вторичные мессенджеры, можно выделить гены *RAF* и *MOS*. Активация *gas*-семейством серин-треонинкиназ наблюдается во многих типах опухолей. Переход *RAF* к состоянию онкогена может произойти в результате сайт-специфических мутаций или мутаций, сопровождающихся преждевременной терминацией трансляции, а также может быть следствием слияния генов с сохранением аминотерминального участка продукта гена *RAF*. Ген *MOS* был идентифицирован по гомологии с *v-mos* онкогеном мышинового вируса саркомы Молони.

Важнейшими участниками цитоплазматической передачи сигнала являются гуанин нуклеотид-связывающие белки (G-белки), которые подразделяют на две группы. Семейство больших G-белков состоит из гетеротримеров,  $\alpha$ -субъединицы которых обладают выраженной эндогенной ГТФ-азной активностью. Малые G-белки являются мономерами. Их достаточно ограниченная ГТФ-азная активность может модифицироваться экзогенными ГТФ-активирующими белками. Большие G-белки участвуют в активации цАМФ-зависимого киназного сигналь-

ного каскада. Мутации в генах  $\alpha$ -субъединиц этих белков обнаруживаются во многих опухолях слизистой человека. Их трансформирующая активность связана с потерей или снижением ГТФ-азной активности, следствием чего может быть пролонгированная активация эффекторных путей сигнальной трансдукции, включая аденилат-циклазный путь, и увеличение продукции цАМФ. Высокая концентрация цАМФ является митогенным фактором в тканях опухолей слизистой, секретирующих ростовые факторы.

Малые G-белки являются важнейшими регуляторами митогенной активности. Среди них наиболее хорошо охарактеризовано семейство *gas*-белков. Предполагается, что *gas*-белки включаются в передачу митогического сигнала после большинства, если не всех, мембраноассоциированных тирозинкиназ, но раньше белков семейства *raf*. Идентифицировано три типа *ras*-онкогенов. *NRAS* экспрессируется в тканях нейробластомы человека, *KRAS* гомологичен онкогену вируса саркомы Кирстена, *HRAS* гомологичен онкогену вируса саркомы Харвея. Все три гена кодируют белки с молекулярной массой 21 кДа, связанные с клеточной мембраной посредством метилирования цитозина в четвертом положении. Эта связь с цитоплазматической мембраной, по-видимому, является определяющей для трансформации. Гиперэкспрессия генов *RAS* не характерна для раковых клеток, тогда как мутации в 12 и 13 кодонах этих генов, а также в 59 или 61 кодонах описаны во множестве типов опухолей. Так, мутации *K-RAS* обнаруживаются в 30–90% случаев рака легких, кишечника и поджелудочной железы.

Митогенные сигналы активируют гены транскрипционных факторов: гетеро- или гомодимерных ДНК-связывающих белков. Многие транскрипционные факторы, участвующие в позитивном контроле прохождения клеточного цикла, были также идентифицированы как продукты вирусных онкогенов. Среди них гены *MYC*, *FOS*, *JUN*, *MYB*, *REL* и *ETS*. В опухолевых тканях чаще всего находят гиперэкспрессию или амплификацию этих протоонкогенов. Классическим примером участия генов транскрипционных факторов в индукции опухолевого процесса является лимфома Беркитта. Во всех случаях заболевания в опухолевых клетках пациентов наблюдается гиперэкспрессия протоонкогена *MYC*, которая является следствием транслокаций между хромосомой 8, где расположен ген *MYC*, и хромосомами 2, 14 или 22, где расположены гены иммуноглобулинов. Промоторные районы этих генов вызывают гиперэкспрессию *MYC*. Степень амплификации гена *MYC* коррелирует со стадией развития опухолевого процесса, и обнаружение подобного генетического нарушения свидетельствует о неблагоприятном прогнозе.

Мутации в генах, участвующих в контроле апоптоза, также могут сопровождаться индукцией канцерогенеза. Протоонкоген *BCL2* был идентифицирован при изучении точек разрывов хромосом в транслокации t(14;18), часто наблюдаемой в В-клетках пациентов с фолликулярными лимфомами. Оказалось, что скорость пролиферации мутантных В-клеток не изменена, но увеличена продолжительность их жизни вследствие нарушения системы программированной смерти. Нарушения в нуклеотидной последовательности в *BCL2* обнаруживаются, а переход к состоянию онкогена связан с гиперэкспрессией транслоцированного аллеля гена, попадающего под контроль регуляторных элементов гена тяжелой цепи иммуноглобулина, локализованного в хромосоме 14.

Вхождение клетки в цикл деления и продвижение по нему требует присутствия в определенных контрольных точках позитивных регуляторов. Такими регу-

ляторами являются *циклины* — небольшие пептидные молекулы, которые на очень короткое время периодически появляются при переходе из одной фазы цикла в другую. Показано, что они могут действовать как онкогены. В неактивном состоянии циклины связаны с членами семейства небольших белков, получивших название циклин-зависимых киназ (СДК), гены которых также относятся к классу протоонкогенов.

## Гены-супрессоры опухолевого роста

На сегодняшний день картирован и клонирован целый ряд генов, вовлеченных в канцерогенез и выполняющих функцию генов-супрессоров. Количество подобных генов составляет более 150. Три главные особенности характерны для генов-супрессоров. Во-первых, гетерозиготы по мутантным аллелям генов-супрессоров имеют повышенную наследственную предрасположенность к возникновению опухолей, дебутирующих в раннем возрасте. Иногда эти опухоли имеют тканеспецифический характер, но чаще могут иметь самую различную локализацию. Во-вторых, в опухолевых тканях пациентов часто присутствуют гетерозиготные микроделеции областей локализации генов-супрессоров. Эти делеции чаще всего выявляют с помощью генетического анализа состояния гипервариабельных микросателлитных маркеров, локализованных внутри генов-супрессоров или тесно сцепленных с ними. При возникновении делеции в области микросателлитного маркера один из аллелей теряется, так что состояние подобного маркера может быть оценено как гомозиготное. Это явление получило название *потери гетерозиготности* — ПГ. Третьей особенностью является то, что в опухолевых тканях часто обнаруживаются мутации во втором гомологичном аллеле гена-супрессора, либо происходит его инактивация за счет метилирования промоторной области. Это приводит к тому, что гены-супрессоры в опухолевых тканях не выполняют свои функции. По мере прогрессирования опухоли частота подобных генетических аномалий возрастает.

По современной, хотя и очень условной, классификации эти гены подразделяются на три группы: *хранители клеточного цикла* (ХКЦ), *гены общего контроля* (ГОК) и *гены, поддерживающие «среду обитания»* (ГСО).

Гены ХКЦ напрямую вовлечены в его регуляцию. Их белковые продукты способны сдерживать опухолевую прогрессию, ингибируя процессы, связанные с делением клетки. Ген *RB1* является одним из ключевых генов-супрессоров, в функции которого входит связывание факторов, способствующих делению клетки, и транскрипционная регуляция клеточного цикла. Продукты генов *p16/CDKN2A* и *p15/CDKN2B* являются ингибиторами циклинзависимых киназ. Гены *NF1* и *TSC2* связаны с увеличением ГТФ-азной активности семейства RAS-белков. Ген *VHL* участвует в протеолизе и, тем самым, — в ответе на антимитогенные сигналы. Классический ген-супрессор *WT1* подавляет транскрипцию генов, продукты которых стимулируют деление клетки. *FHIT* кодирует белок, обладающий способностью расщеплять нуклеозиды. Гены *APC* и *NF1* участвуют в образовании межклеточных контактов.

Мутации или структурные изменения, нарушающие функцию ХКЦ, предрасполагают к возникновению опухоли. Для того чтобы опухоль стала злокачественной, необходима еще одна мутация в неизменном аллеле гена. Это может быть

и точковая мутация, и потеря нормального аллеля, и его функциональная инактивация. То есть для развития злокачественной опухоли необходимо два этапа.

Вторая группа генов поддерживает стабильность генома, прямо или косвенно участвуя в репарации повреждений ДНК. ГОК можно разделить на две группы: 1) гены, непосредственно участвующие в образовании репарационных комплексов и 2) гены, продукты которых ответственны за организацию задержек клеточного цикла, необходимых для репарации ДНК.

Первую группу составляют несколько подгрупп. В одну из них входят пять генов — *MSH2*, *MSH6*, *MLH1*, *PMS1* и *PMS2*, повреждение которых приводит к развитию наследуемого неполипозного рака толстого кишечника, составляющего 10–15% всех случаев развития опухолей этого типа. Эти гены человека близки к бактериальным генам системы репарации повреждений ДНК семейства *MutHLS*. В другую подгруппу входят гены эксцизионной репарации, повреждение в любом из которых приводит к пигментной ксеродерме — заболеванию, характеризующемуся сверхчувствительностью к ультрафиолету и повышенной предрасположенностью к раку кожи. Продукты этих генов образуют многокомпонентный репарационный комплекс, куда входят ДНК-связывающий белок, ДНК-хеликазы, эндонуклеаза, специфичная для одноцепочечной ДНК, и другие белки. В третью — гены, отвечающие за репарацию двухцепочечных разрывов — *BRCA1* и *BRCA2*. Эти гены отвечают за наследственную предрасположенность к развитию рака молочной железы. Мутации одного из этих генов наблюдают в 5–10% опухолей этого типа.

К генам второй группы относится широко известный ген-супрессор — *p53*, мутации или делеции которого наблюдают практически во всех типах опухолей, особенно в терминальных стадиях. Белок *p53* способен функционировать как активатор транскрипции. Показано, что множественные повреждения ДНК вызывают экспрессию гена *p53*, который в свою очередь, активирует транскрипцию гена *WAF1*, кодирующего ингибитор циклинзависимых киназ *CIP1*. *CIP1* избирательно подавляет активность циклин *D1/CDK4* и циклин *E/CDK2*-комплексов, что приводит к задержке перехода клетки из фазы  $G_1$  в фазу *S*. Запускающая этот каскад индукция *p53* происходит в ответ на любые неспецифические повреждающие ДНК воздействия таких агентов, как ионизирующая радиация, свободные радикалы, действие эндонуклеаз рестрикции и др. Одновременно с подавлением репликации ДНК белок *p53* стимулирует ее репарацию, активируя транскрипцию гена *GADD45*, а также связываясь с белком *ERCC3*, непосредственно участвующим в распознавании и вырезании поврежденных участков ДНК. Несмотря на то, что утрата нормальной функции *p53* ослабляет способность клетки репарировать поврежденную ДНК, нормальные клетки значительно чувствительнее к радиационному облучению, чем клетки, в которых повреждены обе копии гена *p53*. Это явление связано с тем, что *p53* играет ключевую роль и в запуске апоптоза. Именно поэтому опухоли, содержащие мутацию обоих аллелей данного гена, хуже поддаются радио- и химиотерапии.

Ген *ATM* принадлежит семейству фосфатидилинозитол-3-киназ и участвует в организации репарационной задержки клеточного цикла в ответ на неспецифические повреждения ДНК. Повреждение обоих аллелей гена приводит к невозможности задержек клеточного деления между фазами  $G_1/S$ , в *S*-фазе и между фазами  $G_2/M$ , что увеличивает уровень нестабильности генома и приводит к возникновению хромосомных aberrаций.

Мутации в этих генах приводят к злокачественным новообразованиям, по крайней мере, в четыре этапа. Нарушение функции одного аллеля не приводит к явным негативным проявлениям. Инактивация второго аллеля приводит к дестабилизации генома клетки, но не вызывает явного опухолевого процесса. Однако все последующие мутации, в том числе и в генах, отвечающих за регуляцию клеточного цикла, накапливаются и вызывают злокачественный процесс.

Предположение о существовании третьего типа генов-супрессоров опухолевого роста впервые возникло при изучении гистологической картины и мутаций, которые были выявлены у пациентов с синдромом ювенильного полипоза. Начальные повреждения у таких больных происходят в стромальных клетках, а не в клетках паренхимы, которые их окружают. Потеря функции ГСО в клетках стромы, по-видимому, приводит к аномальному функционированию белков внеклеточного матрикса, поверхностных клеточных маркеров, адгезионных молекул и факторов роста. Такое измененное микроокружение создает все условия для роста опухолевых клеток, что и приводит к злокачественной трансформации клеток паренхимы. Опухоль в основном состоит из клеток паренхимы, а измененные стромальные клетки составляют очень малую часть, хотя именно они и являются инициаторами злокачественного процесса. К этой группе генов относятся *PTEN* и *DPC4*, повреждения которых ассоциированы с синдромом ювенильного полипоза.

Герминальные мутации в этих трех группах генов приводят к хорошо охарактеризованным синдромам или определенным формам опухолей, в то время как повреждение конкретного гена в различных тканях (соматическая мутация) может приводить к различным опухолям (см. раздел «ДНК-диагностика наследственных форм рака»).

## Взаимодействие генов, регулирующих клеточный цикл

Злокачественная трансформация клетки является процессом многоступенчатым, включающим накопление мутаций и других структурных и функциональных изменений в геноме клетки. Особенно важным фактором, влияющим на развитие опухоли, является комплексное повреждение генов, контролирующих клеточную пролиферацию, дифференцировку, морфогенетические реакции и апоптоз. В качестве примера взаимодействия генов, регулирующих клеточный цикл, можно привести путь регуляции, ключевым звеном которого является ген *RB1*. Действие *RB1* тесно связано с функционированием многих других генов-супрессоров и протоонкогенов, продукты которых влияют на активность *RB1* (рис. 72).

Одним из часто повреждаемых при злокачественных новообразованиях локусов является участок хромосомы 9 (9p21). Особенностью этого района является то, что он содержит гены, кодирующие три негомологичных ядерных белка — p16/INK4a, p15/INK4b и p14/ARF (продукты альтернативных рамок считывания), выполняющих в клетке супрессорные функции. Ядерный белок p16/INK4a обладает способностью связывать циклинзависимые киназы Cdk4 и Cdk6, что препятствует образованию функционально активных комплексов циклинзависимых киназ Cdk с циклинами D, которые фосфорилируют RB1 и вызывают высвобождение фактора транскрипции E2F из комплекса с белком RB1. В резуль-

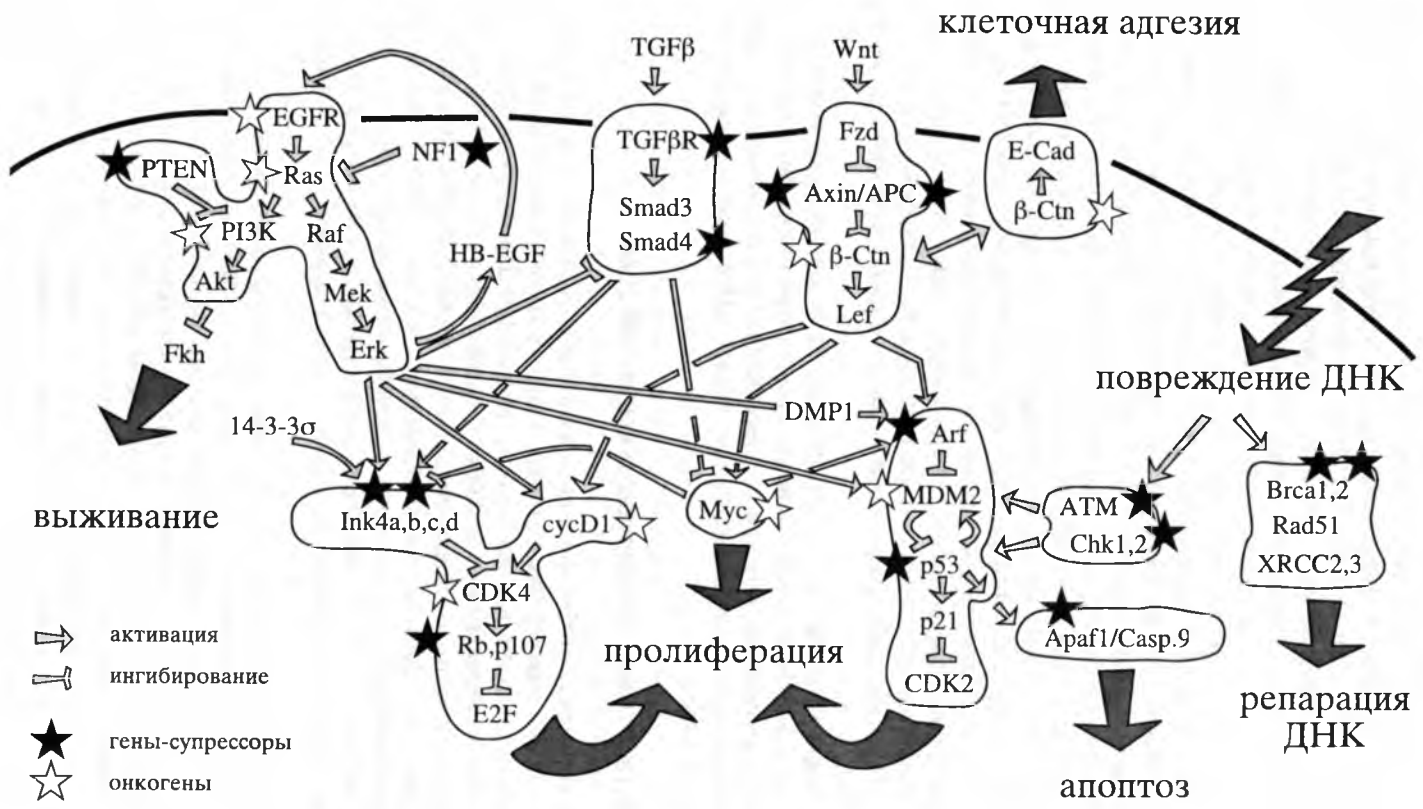


Рис. 72. Взаимодействие генов, участвующих в процессе канцерогенеза

тате происходит активация E2F, повышается уровень активности различных клеточных генов, и инициируется переход клетки в S-фазу клеточного цикла. Механизм инактивации циклинзависимых киназ с помощью p16 является наиболее изученным способом негативной регуляции активности *RB1* в клетке.

pARF способен стабилизировать и активировать другой известный ген-супрессор *p53* при экспрессии некоторых вирусных и клеточных онкогенов. Совместное функционирование *p53* и *RB1* необходимо для регуляции апоптоза.

Активность p16 и pARF в свою очередь повышается при экспрессии ряда протоонкогенов (*Myc*, *Ras*, *Raf*), что в норме предотвращает дальнейшее размножение клеток, в которых произошла активация одного из представителей онкогенов. Такой эффект объясняется присутствием в локусе *CDKN2A/ARF* участков связывания с фактором транскрипции E2F, который активируется многими онкогенами. Мутации и метилирование локуса *CDKN2A/ARF*, вызывающие инактивацию одного из его белковых продуктов (p16, p15 и pARF), были обнаружены в различных злокачественных новообразованиях человека, например, в наследственных и спорадических меланом, а также при раке поджелудочной железы, пищевода, мочевого пузыря, глиобластомах, острых лимфолейкозах.

Один из известных клеточных протоонкогенов *Ras* играет центральную роль в передаче внутреннего митогенного сигнала. Запуск киназного каскада *Raf–Mek–Erk*, инициируемого геном *Ras*, осуществляет передачу сигнала пролиферации от мембраны к ядру клетки. Это еще один путь влияния этого онкогена на активность RB1. При активации протоонкогена *Ras* происходит распределение импульсов по отдельным сигнальным путям через эффекторные белки. Наиболее изученными мишенями *Ras*-белка является ген *Raf*, который стимулирует каскад MAP-киназ и фосфатидилинозитол-3'-киназы (PI3K). В свою очередь, семейство MAP-киназ (mitogen-activated protein) участвует в каскаде запуска циклинзависимых протеинкиназ, активация которых необходима для фосфорилирования RB1.

Другим механизмом, опосредованно влияющим на функционирование системы CDK–RB1 является путь, вовлекающий ген-супрессор *APC*.  $\beta$ -катенин — один из факторов транскрипции, активность которого регулируется путем связывания с E-кадгерином (E-кадгерин — трансмембранный гликопротеид, который участвует в образовании межклеточных контактов). Инактивация гена *APC* или мутации в гене  $\beta$ -катенина (*CTNNB1*) уменьшают связывание этого транскрипционного фактора с E-кадгерином, стимулируя образование комплекса  $\beta$ -катенин/Tcf4, мишенью которого является ген циклина *D1* и протоонкоген *Myc*. В результате этого процесса происходит активация циклинзависимых киназ (комплексов циклин D/cdk4,6 и циклин E/cdk2) и соответственно, фосфорилирование RB1, обуславливающее переход клетки в S-фазу. Мутации в генах *CDH1* (E-кадгерин),  $\beta$ -катенина и *APC* были обнаружены в наследственных и спорадических опухолях желудочно-кишечного тракта, а также при спорадических опухолях молочной железы и яичников. Предполагается, что онкогенный эффект мутаций гена *CDH1* связан с нарушением морфогенетических реакций клетки (разобщением межклеточных контактов), что может, в свою очередь, оказывать влияние на функциональную активность гена *p53*.

Одним из важных сигнальных путей регуляции клеточной дифференцировки и взаимодействия матрикса и клеток между собой, является путь, опосредован-



ный через фактор роста TGF $\beta$  и семейство Smad-белков. Цитокин TGF $\beta$  участвует в регуляции пролиферации нормальных эпителиальных, эндотелиальных и гемопоэтических клеток по следующему механизму. Активированные рецепторы TGF $\beta$  фосфорилируют специфические сигнальные молекулы – белки Smad2 и Smad3, что вызывает их связывание с фактором транскрипции Smad4. Образующиеся комплексы переносятся из цитоплазмы в ядро клетки, где они регулируют транскрипцию генов-ингибиторов циклинзависимых киназ *p21/waf1*, *p15/cdkn2a* и *p21/kip1*. В результате активации этих генов блокируется фосфорилирование RB1 и, как следствие, происходит задержка клетки в G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-фазе. Инактивирующие мутации генов этого каскадного пути характерны для опухолей толстого кишечника, рака поджелудочной железы, желчного пузыря, легких.

Столь тесная взаимосвязь множества клеточных генов в регуляции процессов пролиферации, дифференцировки и апоптоза позволяет предположить возможность их комплексного повреждения в ходе канцерогенеза и искать причинно-следственную связь инактивации этих генов в процессе опухолевой трансформации конкретного типа клеток.

## Двухударная модель канцерогенеза

Ген *RB1* был первым идентифицированным геном-супрессором опухолевого роста, на примере которого была сформулирована двухударная теория канцерогенеза Кнадсона. Эта гипотеза предполагает, что для перехода нормальной клетки в опухолевую необходимо два последовательных мутационных события («удара»). Первым событием является мутация, приводящая к образованию клетки, для которой повышен риск злокачественной трансформации. Такие мутации могут возникать как в соматических, так и в половых клетках. Показано, что при локализации первой мутации в клетках сетчатки возникает доброкачественное новообразование – ретинома. Для развития спорадической ретинобластомы необходимо появление в одной клетке двух соматических мутаций. Если же мутантный аллель гена *RB1* унаследован от одного из родителей, то вторая мутация, возникающая в ретинеме в 90% случаев приведет к развитию опухоли. Вторым «ударом», происходящим в соматической клетке, является мутационное событие в неповрежденном аллеле гена и превращение клетки с повышенным риском трансформации в раковую. Клетка начинает безостановочно делиться, что приводит к возникновению злокачественной опухоли.

В дальнейших исследованиях двухударная гипотеза была успешно подтверждена. Было показано, что в ряде случаев в ретинобластомах наблюдается гомозиготность по некоторым полиморфным ДНК-маркерам, в то время как в крови у этих больных отмечалась гетерозиготность по этим же маркерам. Было установлено, что потеря копии гена – это второе мутационное событие.

В настоящее время в первоначальный вариант двухударной модели канцерогенеза внесены некоторые дополнения. Раньше считалось, что для ретинобластомы одним из необходимых этапов в развитии опухолевого процесса является мутация (структурное изменение нуклеотидной последовательности ДНК). Было показано, что вторым этапом опухолеобразования является либо независимое мутационное событие во втором аллеле гена *RB1*, либо потеря участка хромосо-

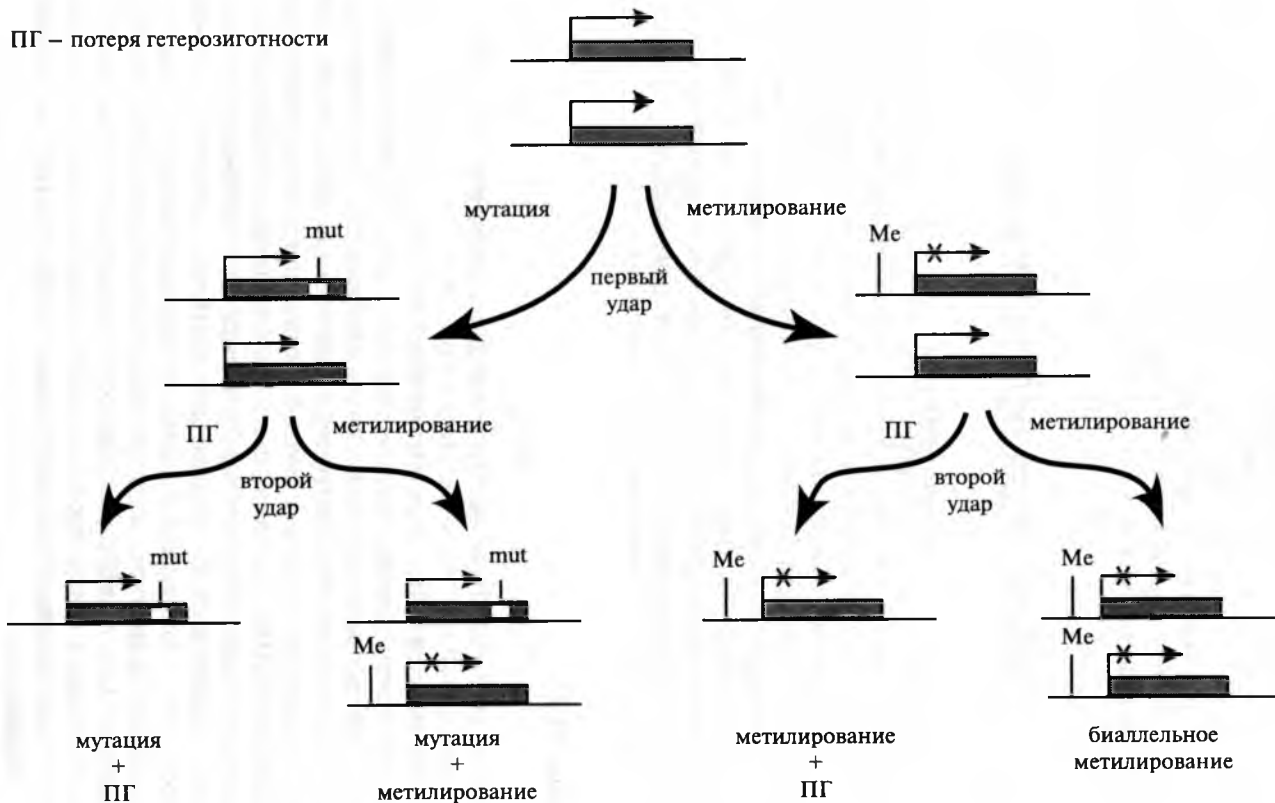


Рис. 73. Современная двухударная модель канцерогенеза

мы, содержащего ген *RB1*, что тоже является структурным изменением ДНК. Такие изменения наблюдались у большинства больных с ретинобластомой, но в ряде случаев причину заболевания установить не удалось. Изменений в кодирующей области гена *RB1* у таких пациентов обнаружено не было, в то время как белок RB1 в опухолевой ткани отсутствовал. Одним из механизмов регуляции экспрессии гена является метилирование промоторной области, что приводит к инактивации гена и может рассматриваться как функциональная делеция (рис. 73).

## 7.2. ЭПИГЕНЕТИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В ОПУХОЛИ

В последнее время показано, что не только генетические факторы могут определять развитие патологического процесса, но и так называемые *эпигенетические факторы* — наследственные и ненаследственные изменения в экспрессии конкретного гена без каких-либо соответствующих структурных изменений в его нуклеотидной последовательности. Все большая роль в возникновении некоторых генетических и многих онкологических заболеваний отводится эпигенетической регуляции активности генов, основанной на аномальном метилировании CpG-островков в промоторных районах, что приводит к их полной инактивации. Таким образом, при отсутствии каких-либо структурных изменений в нуклеотидной последовательности ген полностью теряет свою активность.

### Метилирование ДНК

Только одно основание ДНК может быть модифицировано посредством ферментативного метилирования — *цитозин*. Метилирование является обратимой ковалентной модификацией ДНК, когда цитозиновый остаток в CG-динуклеотиде метилируется в позиции N<sub>5</sub> пиримидинового кольца (рис. 74). Метилирование цитозиновых остатков осуществляется с помощью ферментов ДНК-метилтрансфераз, которые переносят метильную группу S-аденозилметионина. Такая модификация является единственно допустимой в физиологических условиях химической модификацией ДНК у позвоночных и стабильно поддерживается в ряду клеточных делений, что обеспечивается целым семейством ДНК-метилтрансфераз. Остатки 5-метилцитозина могут удаляться из ДНК благодаря активности недавно обнаруженной гликозилазы или ДНК-деметилазы. Это наиболее вероятный кандидат на роль фермента, осуществляющего деметилирование генома в опухолевых клетках. Он способен узнавать метилированные CpG-динуклеотиды, трансформировать 5-метилцитозин в цитозин, не нарушая целостности ДНК, и осуществлять деметилирование на значительном участке нуклеотидной последовательности.

Мишенью метилирования в ДНК служит последовательность CpG. В геноме встречаются два типа распределения CpG-динуклеотидов: рассеянные CpG, встречаемые в геноме в виде отдельных динуклеотидов и составляющие около 80% всего количества, и районы обогащения CpG, называемые CpG-островками.



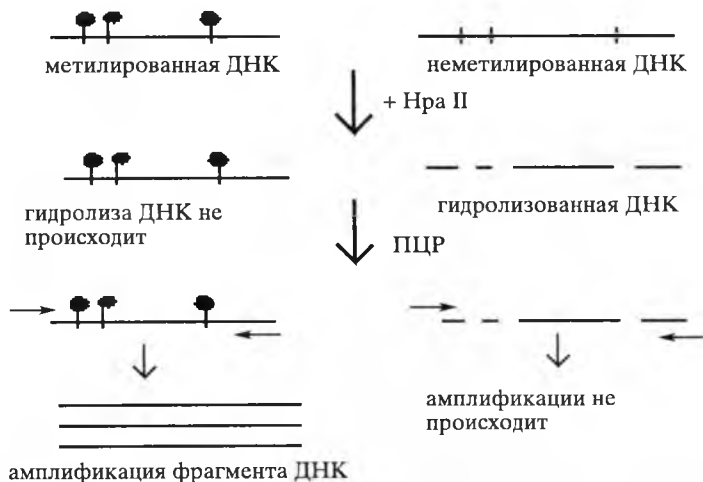
сти, метильные группы нарушают ДНК-белковые взаимодействия в результате выступления в большую бороздку ДНК, тем самым препятствуя связыванию специфических транскрипционных факторов. Кроме того, метилированные районы ДНК могут специфически связывать белки, являющиеся транскрипционными репрессорами, которые могут опосредованно модифицировать состояние хроматина (см. вкл. рис. 75). Процесс заключается в связывании метилированными районами транскрипционного репрессора MeCP2, который является составной частью белковых комплексов, содержащих ко-репрессоры и деацетилазу гистонов. Деацетилирование гистонов приводит к более плотной упаковке нуклеосом и вызывает полную инактивацию гена. Таким образом, метилирование ДНК и деацетилирование гистоновых белков являются взаимодополняющими процессами, участвующими в изменении структуры хроматина определенного хромосомного локуса и приводящими, соответственно, к отсутствию экспрессии генов без их структурных нарушений. В последнее время (2002 г.) установлено, что процессы метилирования и деацетилирования могут происходить не последовательно, а параллельно.

## Методы анализа метилирования ДНК

Современные методы анализа метилирования ДНК в геноме можно условно разделить на две группы. К первой можно отнести методы анализа метилирования известных генов, которые используются в практической ДНК-диагностике. Эти методы достаточно просты в исполнении, эффективны и экономичны. Вторая группа методов предназначена для анализа профиля метилирования всего генома, для поиска аномалий метилирования генов в определенном типе опухолей или на разных стадиях онкологического процесса и для поиска новых генов, вовлеченных в канцерогенез. Эти методы более трудоемки, капризны, не экономичны и не могут быть использованы как рутинные.

### Первая группа методов.

1. *Метилчувствительная полимеразная цепная реакция (МЧ-ПЦР)* основана на использовании рестрикционных эндонуклеаз, чувствительных и нечувствительных к метилированию остатков цитозина. Для анализа метилирования конкретных специфических последовательностей нуклеотидов можно использовать метилчувствительные рестриктазы *HhaI*, *EagI*, *NotI*, *SacII*, *BssHI* и др., но наиболее эффективными являются часто шепящие *HpaII* и *HhaI*, так как районы CpG-островков имеют множество сайтов их узнавания, что практически устраняет возможность неполного гидролиза ДНК. Если фрагмент ДНК не содержит модифицированных оснований, то гидролиз проходит полностью, ПЦР не идет и, соответственно, ее продукт не определяется (рис. 76). В то же время, если в сайте узнавания рестриктазой вместо цитозина присутствует метилцитозин, то гидролиз не происходит и в геле выявляется фрагмент определенной длины. Единственным недостатком этого метода является то, что могут быть проанализированы только CpG-динуклеотиды, попадающие в сайт узнавания конкретной рестриктазы. Большим достоинством его является высокая чувствительность, позволяющая анализировать метилированные аллели в присутствии большого избытка аллелей дикого типа.



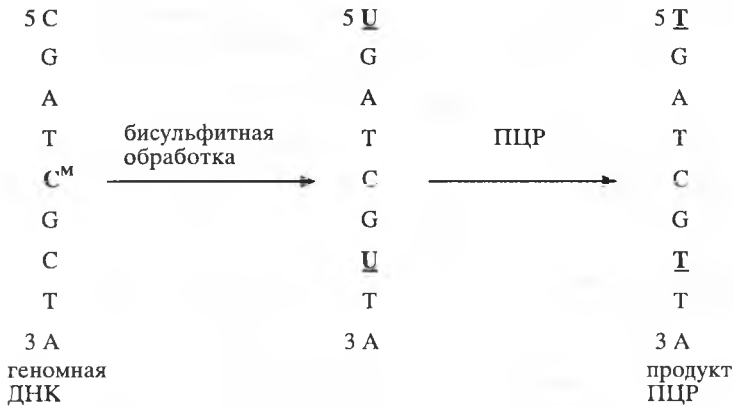
**Рис. 76.** Схема метилчувствительной ПЦР

2. *Метилспецифическая полимеразная цепная реакция (МС-ПЦР)* — метод, позволяющий оценить статус метилирования индивидуальных CpG-островков. Тестируемые образцы ДНК предварительно обрабатываются бисульфитом натрия, что при определенных условиях приводит к дезаминированию цитозина с образованием урацила, тогда как метилированные остатки цитозина остаются неизменными (рис. 77). При проведении последующей ПЦР урацил заменяется тимином. Таким образом, оказывается возможным конструировать праймеры, избирательно выявляющие участки ДНК, содержащие или не содержащие метилированные остатки цитозина в CpG-островках. Чувствительность метода составляет: один метилированный аллель на 1000 неметилированных. Преимуществами МС-ПЦР являются: а) возможность анализа при малом количестве ДНК; б) высокая чувствительность и специфичность; в) простота и скорость выполнения диагностики.

3. На основе бисульфитной модификации ДНК разработано несколько вариантов метода, в том числе и *картирование всех метилированных цитозиновых остатков* в известной нуклеотидной последовательности. Метод, как и предыдущий, основан на превращении всех неметилированных остатков цитозина в урацил в результате обработки ДНК бисульфитом натрия. В результате модификации цепи ДНК оказываются некомплементарными друг другу. Амплификация исследуемой последовательности с помощью ПЦР и последующее прямое секвенирование выявляют как цитозин только те цитозиновые остатки, которые в исходной цепи были метилированы. Метод позволяет выявлять те динуклеотиды CpG в составе островков, метилирование которых необходимо и достаточно для подавления транскрипции соответствующего гена.

#### **Вторая группа методов**

4. *Амплификация метилированных CpG-островков* — основанный на ПЦР метод, позволяющий избирательно амплифицировать CpG-островки, дифферен-



**Рис. 77.** Схема метилспецифичной ПЦР

циально метилированные в нормальных и опухолевых клетках. ДНК вначале обрабатывают рестриктазой *SmaI* (сайт узнавания CCCGGG не расщепляется, если он содержит 5-метилцитозин), которая дает фрагменты с «тупыми» концами. Затем метилированные сайты CCCGGG расщепляются рестриктазой *XmaI*, которая формирует фрагменты с «липкими» концами. Именно последние способны взаимодействовать с адаптерами и амплифицироваться в последующей ПЦР. В сочетании с методом репрезентативного дифференциального анализа этот подход позволяет избирательно амплифицировать CpG-островки, аномально метилированные в опухолевых клетках. Метод может быть использован для поиска новых генов, подвергающихся метилированию в опухоли. Существенными ограничениями являются: 1) отсутствие соответствующих сайтов рестрикции в островке и 2) неполный гидролиз ДНК.

5. *Рестрикционно-ориентированное геномное сканирование* позволяет одновременно анализировать статус метилирования в геноме нескольких тысяч CpG-островков. Суть его заключается в разделении рестрикционных фрагментов, полученных обработкой геномной ДНК несколькими рестриктазами, с помощью двумерного электрофореза. Вначале ДНК обрабатывают крупнощепляющей рестриктазой *NotI*, которая расщепляет только неметилированные CpG. После мечения концов полученных фрагментов радиоактивной меткой полученные участки ДНК обрабатывают вторым ферментом (например, *EcoRV*) для уменьшения их размеров, а продукты гидролиза разделяют в одном направлении — в капилляре с агарозным гелем. Разделенные фрагменты *NotI/EcoRV* обрабатывают в геле еще одним ферментом (например, *HinfI*), после чего проводят электрофорез в полиакриламидном геле во втором направлении. Гель автографируют и в результате выявляют множество пятен, по интенсивности которых судят о степени метилирования соответствующего CpG-островка, т.к. положение пятен строго определено. Интенсивность пятна, принятая за нормальную, свидетельствует о неметилированном статусе обоих аллелей, наполовину сниженная — о метилировании одного из аллелей, исчезновение пятна — о метилировании

обоих аллелей, т.к. соответствующий сайт не расщепляется *NotI*. Метод трудоемок, интерпретация результатов неоднозначна, и он может быть использован только для поиска новых CpG-островков генов, метилированных в определенном типе опухоли.

6. Еще одним многообещающим подходом, разрабатываемым в последнее время, является *метилспецифический фингерпринтинг* (МСФ). Этот метод направлен на выявление аномального метилирования новых генов, вовлеченных в канцерогенез, в различных формах опухолей или на разных стадиях злокачественного процесса. В качестве первого шага проводится гидролиз геномной ДНК с использованием двух ферментов рестрикции, один из которых является метилчувствительным. В первом варианте метода олигонуклеотидные праймеры для ПЦР являются неспецифическими, содержащими только цитозин и гуанин, что характерно для CpG-островков промоторных областей генов. Во втором варианте метода могут быть использованы наборы специфических праймеров для CpG-островков определенных генов, но ПЦР проводится в очень мягких условиях. В результате неспецифической амплификации после электрофореза исследуемой ДНК наблюдается набор полос различной молекулярной массы (фингерпринт). Сравнение картины амплификации, полученной на образцах ДНК из нормальных тканей и опухолевого материала, позволяет определить необычные фрагменты, которые могут свидетельствовать об аномальном метилировании какого-либо гена/генов при заболевании. Получаемая картина достаточно сложна, так как в опухоли происходит инактивация/активация не только явных генов-супрессоров, но и многих тканеспецифических генов, а новые фрагменты могут как появляться, так и исчезать. Такие фрагменты клонируют, секвенируют и определяют их принадлежность к определенному гену. Если нуклеотидная последовательность не имеет гомологии с уже известными последовательностями в базах данных, можно предполагать наличие нового гена, клонирование и картирование которого является технологическим процессом. В результате такого подхода уже выявлено несколько новых генов, вовлеченных в опухолевый процесс.

7. В настоящее время предпринимаются шаги по разработке *микрочиповых методов диагностики* статуса метилирования промоторных районов генов. Подход будет применим как к исследовательским работам, так и к рутинной ДНК-диагностике.

## Метилирование генов, вовлеченных в канцерогенез

Исследования эпигенетической регуляции экспрессии генов в онкологии в последнее время приобрели особенно большой вес, причем как научный, так и практический. Основными генетическими механизмами опухолеобразования до недавнего времени считались структурные изменения некоторых генов-супрессоров в качестве первой мутации, вызывающей гиперпластический, но не злокачественный процесс, и потеря неизмененного аллеля гена уже в опухоли, что является маркером злокачественной трансформации. Функциональный анализ определенных генов в злокачественной опухоли показывает отсутствие экспрессии одних и гиперэкспрессию других, однако механизмы, приводящие к этому, были не ясны. Оказалось, что одним из наиболее значимых механизмов канцерогенеза является *аномальное метилирование CpG-островков генов-супрессоров в опухоли*, расположенных как в промоторной области, так и внутригенных. Таким образом,



метилование с последующей инактивацией генов-супрессоров может выступать и как первая, и как вторая, но функциональная мутация (см. рис. 72). Для некоторых генов было показано, что именно метилирование как одного, так и обоих аллелей является причиной развития опухоли (табл. 19).

В связи с этим, определение профиля метилирования известных и вновь клонированных генов-кандидатов, одной из функций которых может являться регуляция клеточного цикла, в образцах различных опухолей, является необходимым моментом в характеристике гена и ДНК-диагностике при определенном заболевании. Таким образом методические подходы, описанные выше, позволяют проводить такой экспресс-анализ и в операционном материале опухоли, и в лимфоцитах крови, что имеет большое значение для выбора тактики лечения конкретного больного.

Сегодня уже известен целый ряд генов, вовлеченных в канцерогенез, инактивация которых в опухоли обеспечивается метилированием их регуляторных районов (табл. 20).

В большинстве случаев лечение рака предстательной железы андрогенами вызывает положительный эффект. Однако некоторые опухоли, которые оказываются нечувствительными к такой терапии, характеризуются агрессивностью и высоким метастатическим потенциалом. В таких опухолях, как правило, промоторная область и первый экзон гена андрогенового рецептора (*AR*) метилируются, что приводит к его инактивации.

Гиперметилование промоторной области гена рецептора эстрогена (*ER*) обнаруживается в опухолях толстого кишечника в 40–70%, молочной железы – в

Таблица 19

## Пути инактивации генов-супрессоров опухолевого роста

Гены	Тип опухолей	Механизм инактивации генов			Механизм двойного события				
		ПГ	Мутации	Метилирование	Гомозиготная делеция	Мутация + ПГ	Мутация + метилирование	Метилирование + ПГ	Биаллельное метилирование
<i>RB1</i>	Ретинобластома	+	+	+	Редко	+	+	+	+
<i>TP53</i>	Различные типы	+	+	-	Редко	+	+	-	-
<i>VHL</i>	Карцинома почек	+	+	+	Редко	+	+	+	?
<i>CDKN2A</i>	Меланома и др.	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>CDKN2B</i>	Лейкозы	+	-	+	+	?	+	+	+
<i>MLH1</i>	Колоректальные раки	+	+	+	?	+	+	?	+
<i>APC</i>	Колоректальные раки	+	+	+	?	+	+	+	?

20–30%, при острых лейкозах – в 60–70%. Недавно клонированный ген *N33* подвергается метилированию в этих же типах опухолей почти в 90% случаев.

Точковые мутации в генах, отвечающих за репарацию ДНК, достаточно редко выявляются в спорадических карциномах желудка и толстого кишечника с нестабильностью микросателлитов. Оказалось, что причиной нестабильности является инактивация гена *MLH1* в результате метилирования промоторного района почти в 100% случаев.

Метилирование промоторного района гена *CDKN2A/p16* обнаружено во многих типах опухолей. В гепатокарциномах и аденокарциномах поджелудочной железы инактивация гена таким способом происходит почти в 70% случаев, при раке легких – в 20–60%, опухолях толстого кишечника – в 25–30%, лимфом – в 5–25%.

Мутации гена глипикана (*GPC3*) обнаружены при синдроме Симпсона–Голаби–Бемеля, одним из признаков которого являются множественные эмбриональные неоплазии. Ген экспрессируется в яичниках, а в ряде клеточных линий

Таблица 20

Примеры генов-супрессоров, CpG-островки которых могут быть метилированы при различных злокачественных новообразованиях

Ген	Локализация	Функция белка	Опухоль
<i>RBI</i>	13q14.1	Регуляция перехода G1 → S фазы клеточного цикла	Ретинобластома, меланома, нефробластома и др.
<i>VHL</i>	3p25	Подавление экспрессии генов, активируемых при гипоксии ( <i>VEGF</i> )	Опухоли почек
<i>INK4A/p16</i>	9p21	Регуляция сигнального пути циклин D/Rb	Рак легких, толстого кишечника, лимфомы
<i>INK4B/p15</i>	9p21	Регуляция сигнального пути циклин D/p53	Острые лейкозы
<i>CDH1</i> (Е-кадгерин)	16q22.1	Участие в формировании межклеточных контактов	Опухоли молочной железы, желудка, печени, мочевого пузыря
<i>APC</i>	5q21	Участие в образовании клеточных контактов	Колоректальные раки
<i>BRCA1</i>	17q21	Участие в узнавании и/или репарации поврежденной ДНК	Рак молочной железы
<i>MLH1</i>	2p22	Репарация неспаренных участков ДНК	Опухоли желудка, эндометрия, толстого кишечника
<i>ER</i>	6q25.1	Рецептор эстрогена	Рак толстой кишки, рак груди, острые лейкозы
<i>HIC1</i>	17p13.3	Транскрипционный фактор	Рак простаты, груди, толстой кишки, опухоли легких, почек
<i>MDG1</i>	1p.35	Регулятор клеточного цикла	Рак молочной железы
<i>GSTP1</i>	11q13	Фермент, участвующий в детоксикации ксенобиотиков	Рак простаты, печени, почек, груди, толстого кишечника
<i>MGMT</i>	10q26	Метилгуанинметилтрансфераза	Опухоли мозга, легких, груди
<i>CALCA</i>	11p15	Кальцитонин	Рак легких, толстого кишечника
<i>THBS1</i>	15q15	Ингибитор ангиогенеза	Острые миелоидные лейкозы

эпителиального рака яичников его экспрессия отсутствует как в результате ПГ, так и в результате метилирования промоторного района.

Тканевой ингибитор металлопротеиназы-3 (ТИМР-3) может подавлять рост опухоли, ангиогенез, прорастание и метастазирование. Показано, что аномальное метилирование промотора гена происходит в различных опухолях: при немелкоклеточном раке легкого в 19–26%, раке молочной железы – в 27%, раке толстой кишки – в 27%, карциноме почки – в 78% и в глиобластомах – в 26% случаев.

В карциномах щитовидной железы мутации гена кадгерина E (*CDH1*), являющегося супрессором процессов прорастания и метастазирования опухоли, практически не обнаруживаются. В то же время, функциональная инактивация гена в результате аномального метилирования промоторной области обнаруживается в различных типах карцином щитовидной железы, причем наиболее характерна для папиллярного рака. Аномальное метилирование гена *CDH1* обнаруживается в 15–80% рака гортани, молочной железы, предстательной железы, матки, желудка, печени, мочевого пузыря. Совсем недавно показано, что инактивация гена сопровождается острыми формами миелоидного и лимфолейкозов.

Метилирование промоторной области гена *GSTP1*, продукт которого является представителем ферментов, участвующих в детоксикации ксенобиотиков, выявлено в опухолях различных тканей, но наиболее часто оно встречается в карциномах предстательной железы, молочной железы и почек.

Мутации гена *VHL* вызывают предрасположенность к гемангиобластомам, карциноме почек, феохромоцитоме и опухолям поджелудочной железы. Установлено, что одним из механизмов инактивации неизмененного аллеля в опухоли является метилирование гена.

При немелкоклеточном раке легкого метилированию могут подвергаться несколько генов. Среди них: ген  $\beta$ -рецептора ретиноевой кислоты (*RARB*) инактивируется в 40% случаев, *p16* – в 50%, *MGMT* – в 21%, *DAPK* – в 19%, *CDH1* – в 18%, *ARF14* – в 8% и *GSTP1* – в 7%. От 2 до 10% опухолей имеют метилирование многих генов, вовлеченных в канцерогенез. Этот так называемый CpG-метилированный фенотип опухоли характерен для колоректальных карцином, мелко-клеточного и немелкоклеточного рака легкого, рака молочной железы и др.

В случае эмбриональной нефробластомы достаточно часто обнаруживают аномальную экспрессию инсулиноподобного фактора роста 2 (*IGF2*). Обычно экспрессия этого гена происходит только с отцовской хромосомы, а материнский аллель гена инактивирован посредством метилирования. В случае однородительской дисомии, когда ген представлен двумя отцовскими копиями, или мутации, приводящей к активации материнской копии, *IGF2* экспрессируется биаллельно. Кроме нефробластомы биаллельная экспрессия гена установлена в части случаев рабдомиосаркомы, карциномы мочевого пузыря, рака легкого, предстательной железы, шейки матки, саркомы Юинга и др. Таким образом, не только наличие метилирования, но и его отсутствие в тех районах, где оно необходимо, может приводить к злокачественному новообразованию.

Анализ метилирования промоторных районов генов, вовлеченных в генез наследственных и онкологических заболеваний, посредством описанных подходов, имеет ряд преимуществ по сравнению с традиционными молекулярно-генетическими методами: однозначность и легкость интерпретации результатов, возможность поставить диагноз в течение двух–трех дней, отсутствие ра-

диоактивно меченных нуклеотидов, технологическая эффективность и низкая себестоимость.

Исследование эпигенетической регуляции экспрессии генов в норме и при патологии является новым направлением в молекулярной генетике человека. Обилие экспериментальных данных о роли таких нарушений в этиологии онкологических и наследственных заболеваний свидетельствует, что установлен новый класс молекулярной патологии. Результаты дальнейших исследований позволят получить дополнительную информацию о закономерностях функционирования генома человека. Это, в свою очередь, приведет к разработке новых эффективных диагностических подходов, новых лекарственных средств и методов терапии.

### 7.3. ДНК-ДИАГНОСТИКА В ОНКОЛОГИИ

Молекулярная диагностика в онкологии представляет собой обширное поле научно-исследовательской деятельности и имеет принципиальное значение для клиники. Условно можно выделить пять основных направлений: 1) диагностика наследственных форм рака; 2) поиск и диагностика молекулярных маркеров неблагоприятного прогноза; 3) поиск маркеров и диагностика микрометастазов; 4) поиск и анализ маркеров, свидетельствующих о начальных стадиях опухолевого процесса; 5) анализ полиморфных ДНК-маркеров, увеличивающих риск развития определенного типа опухоли.

#### Диагностика наследственных форм рака

Классическим примером гена-супрессора, осуществляющего негативную регуляцию клеточного цикла, является ген *RB1*. Предрасположенность к возникновению ретинобластомы, злокачественной опухоли сетчатки глаза, обусловлена наличием герминальной мутации в одном из аллелей гена *RB1*, передающейся потомству по аутосомно-доминантному типу наследования с варьированием экспрессивности и неполной (90%) пенетрантностью. Опухоль развивается в результате инактивации неповрежденного аллеля гена, происходящей с высокой вероятностью в клетках сетчатки у детей в раннем возрасте или даже внутриутробно. Мишенью возникновения второй мутации могут быть и другие соматические клетки, поэтому у пациентов, несущих герминальную мутацию в *RB1*, существует большой риск развития различных опухолей, таких как остеосаркома, лимфоклеточный лейкоз, мелкоклеточный рак легких, рак груди, опухоли половых органов. За такими больными с наследственной формой заболевания необходимо регулярное наблюдение в онкологических диспансерах. Соматические мутации гена вызывают только ретинобластому, хотя нарушения функции *RB1* обнаруживают во многих других опухолях, но уже как вторичные, являющиеся признаком дестабилизации генома опухолевой клетки (табл. 21).

Нефробластома является генетически гетерогенным заболеванием, но около 30% случаев возникает в результате инактивации гена-супрессора *WT1*. Гемизи-

## Наследственная патология, вызываемая мутациями в генах-супрессорах опухолевого роста

Ген	Соматические мутации			Наследственные мутации		
	Локализация	Основной тип мутаций	Опухоли	Синдром	Частота	Типичные опухоли
<i>p53</i>	17p13.1	миссенс	практически все	Ли-Фраумени	1:50 000	карцинома мол. железы, саркомы, лейкемия, опухоли мозга
<i>RBI</i>	13q14.1	делеции и нонсенс	ретинобластома, остеосаркома, карциномы мол. железы, простаты, мочевого пузыря, легких	Ретинобластома	1:13 000	ретинобластома и остеосаркома
<i>APC</i>	5q21	делеции и нонсенс	карциномы толстого кишечника, желудка, поджелуд. железы	Семейный полипоз	1:8000	карциномы толстого кишечника, желудка, щитов. железы
<i>ATM</i>	11q22	делеции	лейкемия	Атаксия-телеангиоэктазия	1:30 000	лейкемия и лимфома
<i>WT1</i>	11p13	миссенс	нефробластома	Нефробластома	1:15 000	нефробластома
<i>BRCA1</i>	17q21	делеции и нонсенс	молочная железа	Семейный рак мол. железы/яичников	1:50 000	карциномы молочной железы и яичников
<i>BRCA2</i>	13q12	делеции и нонсенс	молочная железа	Семейный рак мол. железы/яичников	1:50 000	карциномы молочной железы и яичников
<i>NF1</i>	17q11	делеции	шваннома	Нейрофиброматоз I	1:3000	шванномы периферической нервной системы
<i>NF2</i>	22q	делеции и нонсенс	шванномы и менингиомы	Нейрофиброматоз II	1:30 000	шванномы и менингиомы ЦНС
<i>p16</i>	9p21	делеции и нонсенс	мезотелиомы, меланомы, глиобластомы	Семейная меланома	1:30 000	меланома
<i>RET</i>	10q21	миссенс	медулярная, папиллярная карциномы щит. железы	МЭН 2А и 2В	1:50 000	медулярный рак щит. железы, феохромоцитомы
<i>VHL</i>	3p25	делеции	нсизвестны	фон Хиппель—Линдау	1:30 000	гемангиобластома, почечно-клеточная карцинома
<i>PTEN</i>	10q23.3	делеции и нонсенс	глиобластомы, рак простаты, молочной железы, неходжкинские лимфомы	Ковдена, Банаяна—Зонана, Банаяна—Райли—Рувалка	1:20 000	рак молочной, щитовидной, предстательной желез, яичников, эндометрия
<i>TSC1</i>	9q34	делеции и нонсенс	гамартомы	Туберозный склероз	1:10 000	гамартомы мозга, глаз, кожи, почек, легких, сердца, костей
<i>TSC2</i>	16p13.3	делеции и нонсенс	гамартомы	Туберозный склероз	1:10 000	гамартомы мозга, глаз, кожи, почек, легких, сердца, костей

готные делеции хромосомного района 11p13 вызывают синдром WAGR, при котором кроме опухоли Вилмса обнаруживаются аномалии развития мочеполового тракта, аниридия и задержка физического и умственного развития. Точковые мутации в 7-10 экзонах, кодирующих мотив цинковых пальцев, определяются у больных с синдромом Дениса–Драша, для которого характерна прогрессирующая нефропатия, псевдогермафродитизм, нефро- и гонадобластомы. Соматические точковые и структурные мутации гена выявлены в мезотелиомах, десмопластических мелко-кругло-клеточных опухолях и при острой лейкемии.

Наследственные формы меланомы, синдрома диспластического невуса и атипичных родинок в ряде случаев вызываются герминальными мутациями гена-супрессора *CDKN2A/p16*. В семьях, имеющих мутацию *CDKN2A*, кроме меланомы обнаруживаются опухоли поджелудочной железы, головы и шеи. В то же время функциональная и структурная инактивация гена, обеспечивающего негативную регуляцию клеточного цикла путем ингибирования циклинзависимых киназ, обнаруживается в различных типах опухолей, но преимущественно — в мезотелиомах, спорадических меланоммах и глиобластомах. Почти треть соматических мутаций гена представлена делециями, в то время как среди герминальных мутаций делеции и инсерции составляют не более 5%.

К хранителям клеточного цикла относятся оба гена *NF1* и *NF2*, вызывающие нейрофиброматоз I и II типов, но выполняющие в геноме различную функцию. Первый обеспечивает негативную регуляцию онкогена *Ras*, второй стабилизирует клеточные контакты. Мутации и структурные перестройки первого гена вызывают шванномы периферической нервной системы, а второго — шванномы ЦНС и менингиомы. По-видимому, негативное влияние мутаций этих генов ограничено только нервной тканью, так как изменений этих генов не обнаружено в опухолях другого происхождения.

Синдромы множественной эндокринной неоплазии I и II типов (МЭН 1, МЭН 2) возникают в результате мутаций в гене-супрессоре *MEN1* и протоонкогене *RET*, соответственно. В случае синдрома МЭН 1 могут развиваться ангиофибромы лица, липомы, коллагеномы, гастриномы и инсулиномы, карциноидные опухоли. Определен спектр мутаций гена и в семейных, и в спорадических случаях синдрома, причем показано, что преимущественного района повреждения и типа мутаций нет.

Герминальные миссенс-мутации протоонкогена *RET* выявлены у пациентов с синдромом МЭН 2А (медуллярный рак щитовидной железы (МРЩЖ), феохромоцитомы, гиперплазия паращитовидных желез, ганглионейромы слизистой губ, щек и языка) и семейной формой МРЩЖ, причем мутации в основном затрагивают пять цистеиновых кодонов в экзонах 10 и 11 и на них приходится 97% и 85% всех мутаций в этих экзонах, соответственно. Спорадические мутации в тирозинкиназном домене гена более характерны для синдрома МЭН 2В, отличающегося от типа 2А более агрессивным течением и отсутствием гиперплазии паращитовидных желез и ганглионейром, а точковая мутация в экзоне 16 (T918C) была идентифицирована в 93% случаев.

Туберозный склероз — достаточно частое аутосомно-доминантное заболевание (1 на 10000), характеризующееся наличием гамартом, развивающихся в мозге, глазах, коже, почках, легких, сердце и костях. Анализ потери гетерозиготности в этих опухолях показал, что теряются маркеры, расположенные в коротком

плече хромосомы 16 (16p13.3) (чаще) и в длинном плече хромосомы 9 — 9q34 (реже). В этих районах были клонированы два гена-супрессора *TSC2* и *TSC1*, соответственно. Анализ показал отсутствие явных «горячих» точек мутаций в генах, хотя для первого характерны точковые мутации сдвига рамки считывания, а для второго — крупные делеции, инсерции и мутации, приводящие к преждевременному прекращению синтеза белка. Миссенс мутации в *TSC2* выявляются редко и повреждают в основном участок между нуклеотидами 1849-1859.

Синдром фон Хиппель—Линдау имеет частоту 1 на 36000 и наследуется ауто-сомно-доминантно. Среди злокачественных новообразований, являющихся диагностическим признаком и позволяющих выделить четыре типа заболевания, наиболее часто встречаются гемангиобластомы ЦНС, карциномы почки, феохромоцитомы и опухоли поджелудочной железы. При заболевании обнаруживаются мутации в гене *VHL*, клонированном в коротком плече хромосомы 3 — 3p25.5. Мутации представлены большими делециями, мутациями сдвига рамки считывания и миссенс мутациями, повреждающими преимущественно 1 и 3 экзоны. Соматические мутации, повреждающие 1 и 2 экзоны гена, выявлены только в изолированных непиллярных карциномах почки. Почти в 20% опухолей обнаружено аномальное метилирование промоторной области гена.

Семейный аденоматозный полипоз желудочно-кишечного тракта — ауто-сомно-доминантное заболевание, вызываемое мутациями в гене *APC*. Вариантом заболевания является синдром Гарднера, при котором преимущественно поражается толстый кишечник. При заболевании достаточно часто выявляются гепатобластомы, опухоли щитовидной железы, медуллобластомы, фибромы и другие опухоли. Основным типом мутаций являются делеции и нонсенс мутации, приводящие к преждевременному окончанию синтеза белка. Герминальные мутации преимущественно повреждают первую половину гена, причем обнаружено два «горячих» кодона — 1061 и 1309. Мутации последнего кодона приводят к раннему появлению полипов и быстрому их озлокачествлению. Соматические мутации в основном локализуются в районе кодонов 1286-1513, с преимущественным повреждением 1309 и 1450 кодона.

Синдром Горлина или базально-клеточных невусов — редкое ауто-сомно-доминантное заболевание (частота 1:57000), проявляющееся множественными аномалиями развития, невусами и различными новообразованиями, наиболее частыми среди которых являются базально-клеточные карциномы, медуллобластомы, астроцитомы, фибромы и карциномы яичников. Синдром возникает в результате мутаций в гене-супрессоре *PTC1*, представленных в 86% делециями и инсерциями и равномерно распределенных по длине гена. Во всех опухолях у синдромальных пациентов и в спорадических базально-клеточных карциномах обнаруживается ПГ по маркерам района 9q22.3.

Целая группа синдромов — Ковдена, Банаяна—Зонана, Банаяна—Райли—Рувалкаба и часть случаев ювенильного полипоза, характеризуется сходными фенотипическими аномалиями и предрасположенностью к злокачественным новообразованиям. Причиной всех заболеваний является патология гена-супрессора *PTEN*. У больных наиболее часто встречаются рак молочной железы, предстательной железы, яичников, эндометрия, щитовидной железы. Мутации равномерно повреждают весь ген и представляют полный спектр. Только при синдроме Ковдена установлено, что 43% мутаций повреждают экзон 5, а в экзонах 1, 4 и

9 мутаций не описано. Соматические делеции и мутации *PTEN* обнаружены в глиобластомах, раках простаты, молочной железы и неходжкинских лимфомах.

Герминальные миссенс мутации **гена-супрессора *p53***, участвующего в задержке клеточного цикла, необходимой для репарации ДНК, приводят к довольно редкому синдрому Ли–Фраумени, при котором типичными являются опухоли мозга, мягкотканые саркомы различной локализации, остеосаркомы, лейкемия и карциномы молочной железы. Выявлена кластеризация мутаций в районе 14 кодонов (245–258). В то же время различные повреждения гена выявляют практически во всех типах опухолей. Частота миссенс мутаций гена составляет 74%, сдвига рамки считывания – 11%, nonsense мутаций – 7%, мутаций сайта сплайсинга – 4%. Определено семь «горячих» точек, повреждаемых мутациями: кодоны 130–142, 151–164, 171–181, 193–200, 213–223, 234–258 и 270–286, причем все они локализованы в эволюционно консервативном ДНК-связывающем домене, кодируемом экзонами 5–8. Мутации кодонов 157 и 179 наиболее часто выявляются при раке легкого, кодона 175 – при раке толстого кишечника, кодона 248 – при сквамозных карциномах головы и шеи, кодона 249 – при гепатокарциноме и кодона 278 – при опухолях кожи.

Атаксия-телеангиоэктазия – аутосомно-рецессивное заболевание, сопровождающееся ломкостью хромосом, причем ионизирующее излучение повышает нестабильность кариотипа. При заболевании наиболее часто обнаруживаются Т-клеточные лейкомии, В-клеточные лимфомы, медуллобластомы и глиомы. Причиной являются гомозиготные мутации или делеции **гена *ATM***, регулирующего клеточный цикл, причем делеции составляют основную массу патологии. У гетерозиготных носителей герминальных мутаций часто возникают карциномы молочной железы. Основным типом являются мутации, приводящие к преждевременной терминации синтеза белка.

Наследственные формы рака молочной железы составляют около 5%. Мутации двух генов, ***BRCA1*** и ***BRCA2***, участвующих в репарации двухцепочечных разрывов, имеют практически равноценный вклад. Кроме рака молочной железы, герминальные мутации ***BRCA1*** повышают риск возникновения рака яичников, а мутации ***BRCA2*** предрасполагают к раку молочной железы у мужчин и раку поджелудочной железы. В то же время, соматические мутации этих генов довольно редки при указанных новообразованиях. Спектр мутаций показывает, что их основная масса приводит к потере функции гена и представлена небольшими делециями и инсерциями, в том числе и в регуляторных областях генов. Две мутации ***BRCA1***, 185delAG и 5382insC, составляют 20%, а мутации 617delT и 997del5 гена ***BRCA2*** составляют почти 33%. Все мутации ***BRCA2***, определяющие высокий риск развития рака яичников локализуются в локусе экзона 11 размером 3,3 т.п.н.

Недавно клонирован еще один ген, участвующий в репарации двухцепочечных разрывов ДНК. Герминальные мутации **гена *NBS1*** приводят к синдрому Ниймиген – очень редкому аутосомно-рецессивному заболеванию, основными признаками которого являются аномалии фенотипа, иммунодефицит, предрасположенность к возникновению опухолей (лимфома, лимфобластная лейкемия, гемобластома, нейробластома) и нестабильность хромосом, чувствительных к ионизирующему излучению. Наиболее характерными мутациями гена являются делеции и инсерции, преимущественно повреждающие экзоны 6 и 7, а мутация 675del5 выявлена у 90% пациентов.



Наследственная форма неполипозного рака толстого кишечника развивается в результате мутаций в генах *MSH2* и *MLH1*, участвующих в образовании репарационных комплексов. Наиболее характерным признаком заболевания является нестабильность микросателлитных последовательностей. У женщин, имеющих герминальную мутацию в одном из этих генов, чаще всего возникают карциномы яичников и эндометрия. Среди мутаций *MSH2* наиболее часто обнаруживается замена А→Т в донорном сайте сплайсинга, приводящая к делеции экзона 5. Для *MLH1* преимущественного типа мутаций не показано, но установлено, что основным механизмом инактивации гена в опухолях является метилирование его промоторного района.

Лечение наследственных форм рака у детей проводится достаточно эффективно, что позволяет им достигать репродуктивного возраста и ставить вопрос о прогнозе потомства. Клонирование генов, вовлеченных в развитие наследственных онкологических заболеваний, практически полностью изменило тактику медико-генетического консультирования. Нет необходимости рассчитывать риски возникновения опухоли у потомства, поскольку определение конкретной мутации конкретного гена в семье позволяет эффективно проводить пренатальную диагностику на ранних стадиях беременности. В случае отсутствия мутации — риск заболевания у ребенка общепопуляционный, а в случае наследования мутации существует возможность проведения профилактических мероприятий на различных этапах жизни, в зависимости от характера заболевания (прерывание беременности, профилактическая хирургия, профилактическая терапия, диспансерное наблюдение пациента).

## Анализ прогностических молекулярных маркеров

Основная масса злокачественных новообразований, кроме указанных выше, возникает спорадически, без отягощенного семейного анамнеза. В этом случае не приходится ожидать эффективного выявления мутаций в определенном гене. При этом изменения происходят в геноме одной соматической клетки, превращающей ее в злокачественную. Эти изменения могут быть не идентичны в одном типе опухоли и у разных пациентов. Они могут быть не идентичны и у одного пациента, и на разных этапах опухолевого процесса. Таким образом, *одной из основных задач онкогеномики является определение наиболее характерных нарушений в определенном типе опухоли — создание своеобразного молекулярного портрета*. К таким нарушениям относятся изменения ploидности кариотипа, делеции, дупликации и структурные перестройки определенных районов хромосом, которые могут быть обнаружены методами классической и молекулярной цитогенетики, и аномальная экспрессия/инактивация или амплификация определенных генов, определяемые методами ДНК-диагностики. *Молекулярный профиль опухоли позволяет прогнозировать развитие заболевания и выбрать тактику лечения*. Ранняя идентификация маркеров неблагоприятного прогноза, связанных с резистентностью опухоли к терапии, имеет большое значение для решения о проведении более агрессивной терапии с момента первичной диагностики. Под неблагоприятным прогнозом развития заболевания подразумевают злокачественность опухоли, ее инвазивность и метастатический потенциал, невосприимчивость к тера-

пии, короткие периоды ремиссий и низкий процент выживаемости. В настоящее время уже накоплено немало данных о молекулярно-генетической структуре определенных опухолей, установлены постоянно выявляемые и характерные для каждой нозологической формы молекулярно-генетические маркеры. Определение этих маркеров может проводиться и в диагностических целях при затруднениях с установкой диагноза по гистологическим препаратам.

Поиск прогностически ценных молекулярных маркеров в случае рака молочной железы является одним из наиболее разрабатываемых направлений исследований. Вот только короткое перечисление маркеров, которые уже могут использоваться в практике. Установлено, что экспрессия и гиперэкспрессия ряда генов в карциномах молочной железы является неблагоприятным признаком развития заболевания. К ним относятся — онкоген *RHMM*, гены циклина *CCND1*, сиалилтрансфераз *ST3Gal III* и *ST6Gal I*, онкоген *HER2/neu*, ген стероидной сульфатазы, кадгерина-11, эстрогеновых рецепторов  $\alpha$  и  $\beta$ , лекарственной резистентности *MDR1*, фактора роста гепатоцитов *HGF* и др. Экспрессия нескольких генов может свидетельствовать об относительно благоприятном прогнозе: антиметастатический ген *nm23*, *ICAM-1*, ген простатаспецифического антигена (*PSA*). Потеря гетерозиготности по маркерам хромосомы 16 (q23.2-q24.2) свидетельствует о благоприятном прогнозе, а при потере гетерозиготности по короткому плечу хромосомы 17 (17p13.3) предполагается неблагоприятный прогноз.

Свидетельством неблагоприятного прогноза в случае рака предстательной железы является гиперэкспрессия орнитиндекарбоксилазы, эктопическая экспрессия *TSPY* (обычно экспрессируется в тестикулах) и отсутствие экспрессии *TGF- $\beta$* .

При немелкоклеточном раке легкого определяют гиперэкспрессию циклинзависимых киназ *cdc25A* и *cdc25B*, снижение экспрессии ингибитора клеточного цикла *p27* и аллельную потерю гена-супрессора *FHIT*, что свидетельствует о неблагоприятном прогнозе, тогда как экспрессия тромбоспондина *TSP2* ингибирует прогрессию и метастазирование опухоли.

Больные с колоректальными опухолями получают неблагоприятный прогноз, если в опухолях обнаружена повышенная экспрессия катепсина В, *CD44*, *p53* и тимидилатсинтетазы, экспрессия генов *MRP1* и рецептора витамина D, отсутствие экспрессии *p21* или ПГ по маркерам длинного плеча хромосомы 18.

Гиперэкспрессия генов *ST3*, *BM-40/SPARK*, *MET*, *uPA* и потеря гетерозиготности по маркерам длинного плеча хромосомы 18 обнаруживается при агрессивных карциномах пищевода и желудка.

Маркерами неблагоприятного прогноза в опухолях поджелудочной железы являются гиперэкспрессия транскрипционного фактора *Id2*, каспазы-1, тимидинфосфорилазы и ПГ по короткому плечу хромосомы 1 и длинному плечу хромосомы 18, где расположены гены *DPC1* и *DCC1*.

Экспрессия опухоль-ассоциированного антигена *GAGE* и гемизиготные делеции длинного плеча хромосомы 10, включая ген-супрессор *PTEN*, свидетельствуют о неблагоприятном прогнозе при наличии глиом. Гиперэкспрессия гена *SPARC* обнаружена в высокоинвазивных менингиомах.

Гиперэкспрессия циклина А является маркером неблагоприятного прогноза при карциноме печени, а циклина D — при саркомах мягких тканей конечностей. Гиперэкспрессия *Lerk-5* выявлена при агрессивных меланомах, а экспрессия кадгерина-6 в карциномах почки коррелирует с низкой выживаемостью.

Таблица 22

## Клинико-генетические типы нейробластомы

Фактор	Тип 1	Тип 2	Тип 3
<i>N-мус</i>	Две копии	Две копии	Амплификация
Плоидия ДНК	Гипердиплоидия/ Триплоидия	Диплоидия/ Тетраплоидия	Диплоидия/ Тетраплоидия
Потеря гетерозиготности 1р	Отсутствует	± Присутствует	Обычно присут- ствует
Потеря гетерозиготности 14q	Отсутствует	± Присутствует	Обычно присут- ствует
Активность теломеразы	Низкая	Варьирует	Высокая
Экспрессия TRK-A	Высокая	Варьирует	Низкая / отсут- ствует
Возраст	Обычно < 1 года	Обычно > 1 года	Обычно 1–5 лет
Стадия	I, II, IVS	III, IV	III, IV
Трехлетняя выживаемость	95%	25–50%	< 5%

Нейробластома — одна из наиболее часто встречающихся и изученных в молекулярном плане солидных опухолей детского возраста. Молекулярные характеристики опухоли в большой степени определяют тактику лечения и прогноз заболевания (табл. 22), так как современные программы терапии позволяют добиться длительных ремиссий у 50–80% пациентов, а рецидивы и прогрессирование опухоли обусловлены резистентностью к химиотерапии первой линии.

### Диагностика минимальной остаточной болезни

Диагностика микрометастазов в крови, лимфатических узлах и костном мозге является совершенно необходимой в случае высоко инвазивных опухолей для контроля эффективности лечения и в периоды ремиссий. Иногда бывает достаточно сложно определить единичные метастатические клетки с помощью цитологических, биохимических и иммунологических методов. Молекулярные методы, имеющие очень высокую чувствительность, позволяют определить 1–2 клетки среди 1–5 млн лимфоцитов. Основным методическим подходом к такой диагностике является ПЦР со вложенными праймерами на обратно транскрибированной мРНК (ОТ-ПЦР), выделенной из анализируемого образца. Экспрессия опухолеспецифических генов, характерная для метастатической клетки, позволяет идентифицировать ее среди миллионов неизмененных клеток крови. Поэтому одной из задач этого направления исследований является определение круга генов, экспрессирующихся только в определенном типе опухоли. Для ряда опухолей такие маркеры уже найдены.

Меланома представляет собой одну из самых агрессивных опухолей, обладающих большим метастатическим потенциалом. Тирозиназа — ключевой фермент в синтезе меланина и наиболее специфический маркер меланоцитов. В норме меланоциты не циркулируют в токе крови и не выявляются в лимфоузлах и костном мозге. В ряде лабораторий показана эффективность определения тирозиназы у больных меланомой. Экспрессия гликопротеина MUC18, участвующего в кле-

точной адгезии, выявляется почти в 100% при агрессивной меланоме и в метастазах. Еще одним, обещающим эффективную диагностику метастазов, маркером является меланома-ассоциированный антиген. Экспрессию  $\beta$ 1-4-N-ацетилгалактозаминилтрансферазы одним микрометастазом удается определить среди 4 млн лимфоцитов периферической крови.

Метастазирующая нейробластома имеет крайне неблагоприятный прогноз и требует более интенсивного лечения и трансплантации костного мозга. Одним из наиболее специфических маркеров нейробластомы является тирозингидроксилаза, участвующая в биосинтезе катехоламинов и не экспрессирующаяся в клетках крови. Поэтому контроль экспрессии фермента в крови и костном мозге у больных нейробластомой является совершенно необходимой диагностикой в клинике.

Цитокератин 19 (ген *CK19*) является одним из наиболее эффективно используемых молекулярных маркеров для определения микрометастазов рака молочной железы. Он не экспрессируется в клетках крови и костном мозге, хотя экспрессируется и в неизменной молочной железе, и в ее опухолях. В настоящее время изучается диагностическая эффективность еще трех маркеров, которые могут оказаться более специфическими. Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) экспрессируется в различных опухолях эпителиального происхождения и гиперэкспрессируется почти в половине случаев рака молочной железы. Показано полное отсутствие ложноположительных результатов при анализе неизмененных лимфоузлов и эффективность выявления аномальных клеток в крови пациентов. Карциноэмбриональный антиген (CEA) экспрессируется при раке желудка, толстого кишечника и молочной железы. При диссеминированном раке молочной железы метастазы удается определить в 60% случаев. Маммоглобин — тканеспецифичный маркер, экспрессируется только в молочной железе, в первичных опухолях, как правило, обнаруживается его гиперэкспрессия. Два последних маркера не дают ложноположительных результатов при анализе нормальных лимфоузлов.

Цитокератин 20 экспрессируется в эпителии желудочно-кишечного тракта и может служить подходящим маркером для определения микрометастазов. Показано, что на более поздних стадиях развития опухоли и метастатического процесса эффективность выявления микрометастазов значительно увеличивается.

Микрометастазы у пациентов с раком легкого, желудка и поджелудочной железы эффективно определяют с использованием гена *CK19*.

Ген, кодирующий простата-специфический антиген (*PSA*), экспрессируется только в предстательной железе, поэтому выявление его в периферической крови, лимфоузлах и костном мозге может свидетельствовать о диссеминирующем раке. Эффективность составляет почти 100%, а чувствительность — одна клетка на 10 млн лимфоцитов.

Саркома Юинга (СЮ) и рабдомиосаркома (РМС) в значительном количестве случаев возникают в результате структурных перестроек хромосом, приводящих к образованию химерных онкогенов. При СЮ наиболее характерны транслокации:  $t(11;22)(q24;q12) - FLI1/EWS$  и  $t(21;22)(q22;q12) - ERG/EWS$ ; РМС:  $t(2;13)(q35;q14) - PAX3/FKHR$  и  $t(1;13)(p36;q14) - PAX7/FKHR$ . Обнаружение этих транслокаций в лимфоузлах, костном мозге и периферической крови свидетельствует о метастазах опухоли. Аналогичная картина обнаружена при липосаркоме мягких тканей. Специфическая транслокация  $t(12;16)(q13;p11)$  приво-

дит к образованию химерного онкогена *FUS/CHOP*, экспрессия которого может быть определена в периферической крови в случае метастазирования опухоли.

## Маркеры, позволяющие определять заболевание на ранних стадиях опухолеобразования

Частота онкопатологии постоянно растет, возраст манифестации заболевания уменьшается, поэтому все большую актуальность приобретает проспективная диагностика онкопатологии (до явной манифестации) в рамках ежегодных диспансеризаций и группах риска. Мониторинг молекулярных маркеров, которые обнаруживаются задолго до клинических признаков, позволяет вовремя начать более тщательную диагностику и превентивную терапию. В пользу того, что аномальное метилирование является одним из наиболее ранних событий в геноме трансформированной клетки, свидетельствует выявление метилирования гена *p16* в гиперплазированном эпителии бронхолегочной системы, метилирование гена *MLH1* в аденомах толстого кишечника и др. Аномальное метилирование гена *p16* является достаточно частым маркером при различных типах рака легкого (правда, в различных соотношениях). Обнаружение этого маркера в мокроте может свидетельствовать о возникновении рака легких задолго до клинических проявлений (за 3–5 лет). Метилирование этого же гена при наличии вирусов папилломы человека 16 и 18 типов с высокой вероятностью свидетельствует о начальных стадиях развития рака шейки матки. Микросателлитная нестабильность и метилирование гена *MLH1*, определенные в плазме крови и/или в образцах ректального смыва, свидетельствуют о начальных этапах развития опухолей желудочно-кишечного тракта. Функциональная инактивация генов *APC*, *CDKN2A* и наличие вируса папилломы неизбежно приводят к раку пищевода.

Прспективная диагностика основана на исследовании ДНК из плазмы крови, мокроты, слюны, желудочного сока, мочи, кала и мазков из половых путей. Механизмы выхода ДНК в плазму крови пока не ясны, но можно предполагать, что это происходит в результате некроза или апоптоза. Тем не менее, наличие свободной ДНК является установленным фактом, позволяющим проводить неинвазивную диагностику.

Наличие аномального метилирования генов *RBI*, *p16*, *MLH1*, *CDH1*, микросателлитной нестабильности и потери гетерозиготности по определенным хромосомным районам, мутаций генов *p53*, *K-ras* и др. в плазме крови с высокой вероятностью свидетельствует о наличии злокачественного процесса. Недавно было установлено, что в 92% случаев гепатоклеточной карциномы обнаруживается метилирование генов *p15* и *p16*, как индивидуальное, так и совместное. При этом у пациентов, где метилирование в опухоли было подтверждено, метилирование этих генов было обнаружено в 74% образцах ДНК, выделенной из плазмы крови, в 87% — из крови и в 100% — из желчи. Кроме того, обнаружение метилирования указанных генов в плазме пациентов после лечения свидетельствовало о наличии метастазов и рецидивов. Метилирование этих же генов при гематологических заболеваниях (лейкозы, лимфомы) также может свидетельствовать о метастазах и рецидиве заболевания.

Приведенные данные позволяют начать разработку проспективных диагностических протоколов, основанных на неинвазивных методах, в рамках ежегод-

ных диспансеризаций. Разработка стандартного набора ДНК-маркеров для наиболее часто встречающихся онкологических заболеваний позволит эффективно проводить скрининг и бороться с онкопатологией на самых ранних этапах ее возникновения, проводить мониторинг заболевания в периоды ремиссий, определять микрометастазы в период лечения и определять тактику терапии в случае инактивации определенных генов-рецепторов.

## Полиморфизмы ДНК, определяющие риск возникновения рака

В последнее время расширяются исследования, связанные с поиском и характеристикой полиморфных вариантов ДНК в кодирующих и некодирующих районах генов, в той или иной степени вовлеченных в канцерогенез. Эти исследования показывают, что полиморфизм ДНК даже вне кодирующей области может быть связан с ослаблением или усилением функции гена. Такие полиморфизмы наиболее часто выявляются в группах больных, страдающих определенной формой заболевания, или не восприимчивых к определенным формам лекарственных препаратов. Определение таких вариантов ДНК в группах риска или семьях позволяет своевременно выявить начало заболевания или проводить профилактическую терапию.

Ген ароматазы *CYP19* кодирует цитохром P450 — фермент, катализирующий переход андрогенов в эстрогены. Активность фермента выявлена в различных тканях, в том числе и в молочной железе и опухолях молочной железы. *CYP 19* имеет 11 описанных полиморфизмов. Исследования показали, что аллель тетра-нуклеотидного повтора (TTTA)<sub>7</sub> в интроне 4 чаще обнаруживается в группе больных, а гомозиготы по этому аллелю имеют родственников, страдающих раком легких, толстого кишечника, яичников и др. В то же время аллель (TTTA)<sub>12</sub> и генотип (TTTA)<sub>11</sub>/(TTTA)<sub>12</sub> в пять раз чаще выявляется у здоровых. Один из полиморфных вариантов в третьем экзоне гена, представленный заменой G→A в 80 кодоне, кодирующем валин, был обнаружен только у больных, имевших генотип повышенного риска — (TTTA)<sub>7</sub>/(TTTA)<sub>7</sub>. Такой генотип может быть ассоциирован с увеличением уровня активности фермента и нечувствительностью к его ингибитору — 4-гидроксиандростендиону.

Другой цитохром — P450 1A1 (*CYP1A1*) метаболизирует углеводороды, обнаруженные в табачном дыме, и тоже имеет полиморфизмы. В частности, показано, что полиморфизм T6235C и полиморфизм A4889G в экзоне 7 выявляются несколько чаще у больных раком молочной железы, начавших курить до 18 лет.

Полиморфизм ДНК в еще одном цитохроме — P450c17α (*CYP17*), участвующем в биосинтезе стероидных половых гормонов, также может повышать риск возникновения рака молочной железы. В 5'-области гена в позиции -27 выявлена однонуклеотидная замена T→C, которая создает сайт узнавания для фермента *MspA1* и транскрипционного фактора Sp1. Показано, что этот аллель влияет на экспрессию гена и увеличивает риск возникновения рака молочной железы в 2,5 раза.

Миссенс мутация в гене *MnSOD*, представленная однонуклеотидной заменой T→C и приводящая к замене валина (V) на аланин (A), выявлена и у здоровых, и у больных раком молочной железы, однако этот полиморфизм у больных встречается чаще. Установлено, что гомозиготы A/A репродуктивного периода имеют

в четыре раза больший риск возникновения опухоли, чем женщины, имеющие один или оба аллеля V.

Катехол-О-метилтрансфераза ингибирует катехолэстрогены. Полиморфизм гена, приводящий к замене валина (V) на метионин (M) и, соответственно, генотипы V/V, V/M и M/M встречаются в нормальной популяции, причем последний из них характеризуется наименьшей активностью фермента и повышает риск возникновения рака молочной железы.

Роль гена андрогенового рецептора (*AR*) в развитии рака предстательной железы уже точно установлена. В первом экзоне располагается полиморфный трехнуклеотидный повтор ( $(CAG)_n$ ), причем транскрипционная активность гена с увеличением количества повторов снижается. В ряде исследований показано, что укороченные повторы, содержащие 18 и менее триплетов, гораздо чаще ассоциированы с раком простаты, чем увеличенные, содержащие 26 и более повторяющихся единиц.

Рак легких вызывается многими причинами, но некоторые полиморфизмы в различных генах markedly повышают вероятность его развития. Установлено, что однонуклеотидная замена  $T \rightarrow C$  в 264 нуклеотидах ниже сайта полиаденилирования *CYP1A1* в 2,4 раза повышает развитие сквамозной карциномы. Этими же авторами показано, что полиморфизм гена *GSTM1*, играющего роль в детоксикации полициклических ароматических гидрокарбонатов, представленный делецией в интроне 6, повышает риск развития сквамозной карциномы у курильщиков в 3,1 раза в сочетании с выше описанным полиморфизмом. В то же время исследования полиморфизмов в гене *CYP2E1* (сайт *DraI* в интроне 6 и сайт *RsaI* в 5'-UTR) показали, что первый из них снижает риск возникновения рака у курильщиков в 5 раз, а второй — в 10. Замена аргинина (A) на пролин (P) в 72 кодоне гена *p53* в результате однонуклеотидной замены  $G \rightarrow C$  и генотип *P/P* заметно увеличивает риск рака легких и ухудшает прогноз заболевания у тайванцев. Предполагается, что два полиморфизма (C190T и G560A) гена N-ацетилтрансферазы (*NAT1*) могут увеличивать риск опухоли у курильщиков. Ген *PADPRP* участвует в репарации, репликации и рекомбинации ДНК и может быть вовлечен в канцерогенез. Его процессированный псевдоген, расположенный на хромосоме 13 (13q33), имеет биаллельный полиморфизм — делецию 193 п.н. (*B*-аллель). Гомозиготный генотип *B/B* повышает риск возникновения аденокарциномы у курильщиков в 2,4 раза.

Полиморфный вариант в гене *GSTP1*, приводящий к замене изолейцина на валин в 104 кодоне, значительно чаще обнаруживается у пациентов с раком мочевого пузыря, тестикул и пищевода.

Динуклеотидный полиморфизм A/G в донорном сайте сплайсинга экзона 4 гена циклина D1 (*CCND1*) приводит к преобладанию более длинного транскрипта. Показано, что пациенты со сквамозной карциномой головы и шеи, гомозиготные по полиморфизму G/G, имеют укороченные периоды ремиссий.

Однонуклеотидный полиморфизм 1G/2G в позиции — 1607 промоторного района гена металлопротеиназы матрикса (*MMP1*) создает новый сайт связывания Ets, что увеличивает транскрипцию гена. В норме частота полиморфизма составляет 30%, а в меланомных клеточных линиях — 65%.

Аллельный полиморфизм протоонкогена *Hras1* может свидетельствовать о неблагоприятном течении рака легкого. Аллель A4 много чаще обнаруживается при агрессивном низкокодифференцированном немелкоклеточном раке легкого.

Другим протоонкогеном, полиморфизм которого имеет значение при прогрессии опухолей, является *L-тус*. Существование двух аллелей гена — длинного и короткого, обусловлено точковой мутацией. Установлено, что у гомозигот по короткому аллелю наблюдается быстрая прогрессия и метастазирование опухоли.

Три функционально значимых полиморфизма гена *p53*, расположенных в интронах 3 и 6 и в экзоне 4, существенно влияют на увеличение риска развития рака молочной железы, рака легкого, рака шейки матки, рака предстательной железы и коррелируют с неблагоприятным прогнозом течения этих заболеваний.

Даже такой, далеко неполный, список полиморфизмов ДНК, предрасполагающих к злокачественным новообразованиям, показывает необходимость и продуктивность расширения исследований в этой области.

## Заключение

Целостная картина молекулярных процессов в раковой клетке определенно-го типа опухоли далеко не завершена. Сейчас она больше напоминает фрагменты мозаики. Интенсивное развитие онкогеномики как составной части исследований в рамках программы «Геном человека», позволит не только внести вклад в понимание фундаментальных процессов канцерогенеза, но уже сейчас может помочь практическому здравоохранению. Молекулярная диагностика наследственных и спорадических форм рака, для которых известна роль конкретных генов, позволяет, в той или иной степени, предотвратить тяжелые последствия онкологических заболеваний. Достаточно часто профилактические мероприятия по предотвращению рождения ребенка с онкологическим заболеванием не только оправданы экономически, но и психологически. Например, затраты на диагностику, лечение, протезирование, реабилитацию и мониторинг пациента с ретинобластомой составляют около 50 тыс. долларов. Профилактические маст- и тиреоидэктомии являются обычной практикой при определении герминальных мутаций в генах *BRCA1*, *BRCA2* и *RET* за рубежом.

Определение маркеров неблагоприятного прогноза позволяет определить тактику лечения заболевания. Затраты на лекарственное обеспечение для лечения больного нейробластомой с амплификацией *N-Мус* составляют 16 тыс. долларов, а без таковой — 5 тыс. Получение молекулярной характеристики опухоли позволяет существенно снижать расходы на лечение пациентов, сокращать сроки их госпитализации при улучшении показателей общей и безрецидивной выживаемости. Обнаружение микрометастазов в процессе лечения дает возможность своевременно изменить схему лечения или начать его в периоды ремиссий.

Изучение факторов предрасположенности к онкологическим заболеваниям, в основе которых лежит полиморфизм ДНК, также является очень актуальной областью исследований, дающей прямой выход в профилактическую медицину. Формирование групп риска, мониторинг носителей определенных полиморфизмов и даже профилактическое их лечение может сократить показатели смертности от онкологических заболеваний.

Исследования эпигенетических механизмов регуляции экспрессии генов уже позволили в ряде случаев установить причины инактивации определенных генов



в опухолях. Аномальное метилирование/деметилование может служить диагностическим и прогностическим маркером, а также позволяет дифференцировать определенные типы опухолей. Характеристика паттерна метилирования известных и вновь клонированных генов в различных тканях и типах опухолей позволит сделать существенный вклад в понимание процессов дифференцировки тканей и канцерогенеза.

В связи с вышесказанным, одной из наиболее важных практических задач ДНК-диагностики в онкологии является создание эффективных и экономичных диагностических протоколов, внедрение которых позволит повысить результативность лечения рака.

## Литература

Канцерогенез. Под ред. проф. Д.Г. Заридзе. М.: Научный мир, 2000. 419 с.

*Лихтенштейн А.В., Киселева Н.П.* Метилирование ДНК и канцерогенез // Биохимия. 2001. Т. 66. С. 293–317.

*Hirsch F.R., Franklin W.A., Gazdar A.F., Bunn P.A.* Early detection of lung cancer: clinical perspectives of recent advances in biology and radiology // Clin. Cancer Res. 2001. Vol. 7. P. 5–22.

*Macleod K.* Tumor suppressor genes // Current opinion in genetics and development, 2000. Vol. 10. P. 81–93.

*Malumbres M., Barbacid M.* To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer // Nature reviews cancer. 2001. Vol. 1. P. 222–231.

*Serrano M., Massague J.* Networks of tumor suppressors // EMBO Reports. 2000. Vol. 1. P. 115–119.

The genetic basis of human cancer. Ed. by B.Vogelstein and K.W.Kinzler. The 2-nd ed. "The McGraw-Hill Companies, Inc.", 2001. 731 p.

# Генетика сахарного диабета типа 1

*В.В. Носиков*

Значение генетических факторов в развитии сахарного диабета (СД) в настоящее время общепризнано. Трудность генетического анализа СД связана с наличием выраженного клинического полиморфизма и с тем, что наследственной отягощенности самой по себе недостаточно для развития СД типа 1. У генетически предрасположенных индивидов это заболевание развивается только вследствие взаимодействия между генетическими факторами и условиями окружающей среды. Поэтому развитие СД типа 1 может быть предотвращено или, как минимум, отложено, и при этом контролируемо внесением определенных изменений в среду, в которой живет индивид. Актуальность исследований в области генетики СД типа 1 определяется необходимостью идентификации генов, предрасполагающих к СД типа 1, и пониманию механизмов развития этого заболевания.

Разработка популяционно-генетических подходов, совершенствование методов статистического анализа, быстрое развитие молекулярной биологии и генетики, позволившее практически завершить проект «Геном человека», – вот те основные факторы, которые позволили получить достаточно данных и уже сейчас ответить на многие вопросы, касающиеся роли наследственных факторов в развитии СД типа 1.

## 8.1. ТИП НАСЛЕДОВАНИЯ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ ТИПА 1

С окончательным утверждением в начале XX в. концепции Менделя о гене как единице наследственности, тип наследования СД стали объяснять, исходя из распределения больных и здоровых родственников в отдельных родословных. Поскольку СД является распространенным заболеванием, естественно, встречались родословные, демонстрирующие любой из простых типов наследования. Наиболее популярной в то время была гипотеза аутосомно-рецессивного наследования СД. Существовали также гипотезы аутосомно-доминантного и рецессивного наследования, сцепленного с хромосомой X.

Совершенствование статистических методов генетического анализа позволило отвергнуть простые моногенные гипотезы наследования СД. В результате наиболее надежных исследований, выполненных на большом материале, было высказано предположение о многофакторной природе СД в целом, а также его основных клинических форм. Предполагалось также, что обе формы СД являются генетически независимыми заболеваниями.

В настоящее время сахарный диабет типа 1 относят к многофакторным, полигенным заболеваниям. СД типа 1 развивается менее чем у половины генетически идентичных близнецов и 2–6% сибсов. Такой низкий уровень семейного риска, не совместимый ни с одной из гипотез моногенного наследования без привлечения дополнительного предположения о неполной пенетрантности (проявляемости, активности) предполагаемого гена, указывает на то, что с формально генетической точки зрения СД типа 1 относится к полигенным заболеваниям.

Многофакторная модель наследования предполагает, что проявление болезни определяется соотношением генетических факторов и факторов окружающей среды. Под генетическими факторами при этом подразумевается наличие у больного определенных аллелей многих полиморфных генов, вовлеченных в развитие СД типа 1, которые в клинической практике получили название «*предрасполагающих аллелей*» или «*генетических маркеров*» СД типа 1. Влияние факторов внешней среды проявляется в том, что наличие генетической предрасположенности далеко не всегда приводит к развитию СД типа 1, что следует из данных о заболеваемости идентичных близнецов, составляющей в разных популяциях от 40% до 50%. Имеющиеся данные свидетельствуют о выраженной роли наследственности в развитии СД типа 1. Именно это и определяет важность учета наследственных факторов при прогнозировании заболевания.

## 8.2. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ САХАРНОГО ДИАБЕТА ТИПА 1

В отличие от моногенных синдромов, сочетающихся с различными нарушениями углеводного обмена, при аутоиммунном сахарном диабете типа 1 причиной заболевания не являются мутации отдельных генов. Генетическая предрасположенность к СД типа 1 связана с наследованием определенных аллелей обычных «здоровых» генов. Иногда эти аллели, которые определяют предрасположенность к СД типа 1 и сцеплены с заболеванием, называют *этиологическими мутациями* или *вариантами*. Часто этиологические варианты широко распространены в популяции, но при этом каждый из них сам по себе не приводит к развитию заболевания. Только наличие определенной комбинации этиологических вариантов в генах, предрасполагающих к заболеванию, может приводить к физиологическим нарушениям, находящим свое выражение в развитии СД типа 1. Однако даже такая наследственная отягощенность сама по себе недостаточна для развития СД типа 1. У генетически предрасположенных индивидов СД типа 1 развивается только вследствие взаимодействия между не изученными до конца генетическими факторами и совсем не известными факторами внешней среды.

Одним из подходов к изучению наследственной предрасположенности к СД типа 1 является изучение ассоциации полиморфных маркеров генов-кандидатов. Если продукт экспрессии гена (фермент, гормон, рецептор, структурный или транспортный белок) может прямо или косвенно участвовать в развитии патологии, то этот ген принято называть «*геном-кандидатом*». В геноме человека суще-

ствует несколько типов полиморфных маркеров. Во-первых, к ним относятся однонуклеотидные полиморфизмы в экзонах, которым иногда соответствуют аминокислотные полиморфизмы, а также однонуклеотидные полиморфизмы, расположенные в интронах, в промоторных или регуляторных областях, в 5'- и 3'-нетранслируемых областях генов. Во-вторых, в качестве маркеров часто используют последовательности ДНК, в которых имеются вставки или делеции одного или нескольких нуклеотидов. В-третьих, к полиморфным маркерам относятся полиморфные мини- или микросателлиты, представляющие собой тандемные повторы с изменяющимся числом повторяющихся единиц. Мини- или микросателлиты могут располагаться или внутри гена, например, в интроне, или рядом с геном в прилежащих районах.

В подавляющем большинстве случаев полиморфные маркеры не являются собственно этиологическими вариантами, которые определяют предрасположенность к СД типа 1, но очень часто они находятся в неравновесии по сцеплению с этими вариантами. Таким образом, по наличию ассоциации или сцепления полиморфного маркера с СД типа 1 можно судить об ассоциации или сцеплении соответствующего этиологического варианта конкретного гена. В реальном эксперименте изучают распределение отдельных аллелей данного маркера или гена в группах, состоящих из здоровых индивидов и больных СД типа 1. В случае положительной ассоциации для одного или нескольких генетических маркеров наблюдается повышение частот аллелей у больных по сравнению с частотами этих аллелей у здоровых индивидов.

В геноме человека с использованием подхода «ген-кандидат» удалось надежно идентифицировать только два локуса, связанных с предрасположенностью к развитию СД типа 1: локус *MHC* (главный комплекс гистосовместимости), расположенный на хромосоме 6 (6p21.3), и полиморфный тандемный повтор (*VNTR*) в 5'-нетранскрибируемой области гена инсулина (*INS*), который расположен на хромосоме 11 в районе 11p15.5. Эти два локуса получили обозначения *IDDM1* и *IDDM2*, соответственно, и они определяют около 42% семейного риска развития СД типа 1.

Для выявления других локусов, содержащих гены, предрасполагающие к СД типа 1, использовали подход, основанный на анализе наследования аллелей полиморфных маркеров в ядерных семьях с двумя sibсами больными СД типа 1 (семьи с конкордантными sibсами). Несмотря на трудности при подборе семей, несколько групп исследователей провели изучение сцепления большого числа полиморфных локусов генома человека с СД типа 1. Дополняющий подход основан на использовании полных семей с дискордантными sibсами.

Наряду с анализом сцепления, при использовании которого необходимы полные семьи с двумя sibсами, в методе неравновесной передачи аллелей (TDT) могут анализироваться семьи с единственным потомком. Этот метод основан на выяснении частоты передачи аллелей полиморфных маркеров (расположенных в интересующей исследователя области генома) от гетерозиготных по данному маркеру родителей к больному потомку. Впервые этот метод был использован для подтверждения сцепления области генома, содержащей ген инсулина, именно с СД типа 1.

Успешная реализация программы «Геном человека» позволила разработать значительное число высоко полиморфных микросателлитных маркеров, распо-

ложенных относительно равномерно практически на всех хромосомах человека. Благодаря этому стало возможным проведение полных геномных поисков с использованием коллекций семей с сибсами, большими полигенными наследственными заболеваниями. Сахарный диабет типа 1 был первым заболеванием этого типа, к которому был применен данный подход.

В первой работе по полному геномному поиску, направленной на выявление локусов, предрасполагающих к развитию СД типа 1, была использована коллекция из 96 ядерных семей (Великобритания) и панель из 290 высоко полиморфных микросателлитных маркеров, более или менее равномерно расположенных на всех хромосомах человека. Это исследование позволило обнаружить в геноме человека 18 локусов возможной предрасположенности к СД типа 1 на разных хромосомах [Davies et al., 1994]. Параллельно был проведен еще один геномный поиск, при котором удалось найти область сцепления с СД типа 1 на хромосоме 11 [Hashimoto et al., 1994].

Несколько позже было проведено еще два полных геномных поиска «второго поколения» [Mein et al., 1998; Concannon et al., 1998] и один частичный поиск [Luo et al., 1996], основывавшихся на первых геномных поисках [Davies et al., 1994; Hashimoto et al., 1994], что позволило уточнить положение ранее обнаруженных локусов и выявить дополнительные локусы сцепления с СД типа 1. И, наконец, в 2001 г. были выполнены еще два полных геномных поиска на коллекциях семей европейского происхождения из скандинавских стран (408 семей) и 767 семьях из США и Великобритании [Cox et al., 2001; European consortium, 2001]. Данные о потенциальных локусах предрасположенности к СД типа 1 суммированы в табл. 23 и далее будет дана характеристика большинства из этих локусов.

**Локус *IDDM1*.** Все проведенные исследования подтвердили важную роль локуса *IDDM1*, находящегося на хромосоме 6 (6p21.3) и занимающего область размером 20 сМ (рис. 78). По сравнению с другими локусами предрасположенности *IDDM1* обладает максимальными значениями  $\lambda_s$ , колеблющимися в различных популяциях европейцев в интервале от 1,7 до 4,2 [Davies et al., 1994; Hashimoto et al., 1994; Mein et al., 1998; Concannon et al., 1998]. Величина *MLS* (отражающая вероятность сцепления) для этого локуса также имеет максимальное значение и достигает величины 33–34 [Mein et al., 1998; Concannon et al., 1998].

Локус *IDDM1* отождествляется с генами главного комплекса гистосовместимости (*MHC* или *HLA*), структурная организация которого представлена на рис. 77. Локус был назван так потому, что гены этого региона определяют скорость, с которой отторгается кожный или другой тканевой трансплантат. Антигены класса II (*HLA-DP*, *DR* и *DQ*) представлены в норме на поверхности некоторых клеток иммунной системы и играют основную роль в регуляции иммунного ответа. Молекулы класса II участвуют в связывании и экспонировании на поверхности макрофагов процессированных пептидных фрагментов различных антигенов. В дальнейшем через посредство Т-клеточных рецепторов происходит распознавание антигенов и инициируется иммунный ответ.

Показано, что молекулы гетеродимеров, образуемых  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепями, которые кодируются генами *HLA-DQA1* и *DQB1*, играют важную роль в обеспечении генетической предрасположенности к СД типа 1. Для генов *DQA1* и *DQB1* характерен значительный полиморфизм, выражающийся в существовании множества алле-

Значения  $\lambda_s$  и MLS для локусов, определяющих генетическую предрасположенность к СД типа 1. Для сравнительного анализа использованы данные, полученные на коллекциях семей из разных популяций

Локус	Ген-кандидат	Хромосомная локализация	$\lambda_s$	Величина MLS (ссылки даны в скобках)				Ссылки
				UK356 <sup>a</sup> [17]	US/UK679 [2]	UF265 [16]	Другие	
<i>IDDM1</i>	<i>MHC</i>	6q21.3	2,60	34	33	—	—	2, 7, 12, 17
<i>IDDM2</i>	<i>INS</i>	11p15.5	1,29	2,8	0,6	—	—	2, 7, 12, 17
<i>IDDM3</i>	—	15q26	—	0,0	0,0	0,2	2,5	2, 10, 16, 17
<i>IDDM4</i>	<i>LRP5</i>	11q13	1,07	0,5 (2,5)	0,4	3,9	1,5	2, 7, 12, 15–17
<i>IDDM5</i>	—	6q25	1,15	1,0 (2,0)	1,5	4,5	3,0	2, 7, 12, 15, 16
<i>IDDM6</i>	<i>DCC</i>	18q21	1,10	1,2 (3,2)	0,0	0,0	2,8	2, 7, 12, 16, 17
<i>IDDM7</i>	—	2q31	1,13	1,0 (1,5)	0,7	0,4	—	2, 16, 17
<i>IDDM8</i>	—	6q27	1,17	1,9 (2,3)	1,1	3,6	3,4	1, 2, 6, 7, 12, 15–17, 22
<i>IDDM9</i>	—	3q21–q25	1,26	1,1 (2,4)	0,2	0,5	—	1, 2, 7, 12, 16, 17
<i>IDDM10</i>	—	10p11.2	1,56	4,7	0,4	0,2	—	1, 2, 7, 12, 16, 17, 23
<i>IDDM11</i>	—	14q24–q31	—	0,0	0,3	1,0	4,0	8, 11, 12, 16, 17
<i>IDDM12</i>	<i>CTLA4</i>	2q33	1,61	0,0	0,9	0,6	3,4	1, 8, 12, 16, 17, 21
<i>IDDM13</i>	—	2q33	1,60	0,0	0,4	0,0	3,3	8, 12, 16–18
<i>IDDM15</i>	<i>TNDM</i>	6q21	1,34	—	2,3	—	4,2	9, 17
<i>IDDM16</i>	—	14q32.3	—	—	—	—	—	—
<i>IDDM17</i>	<i>FAS</i>	1q22.3	—	—	—	—	—	—
<i>IDDM18</i>	<i>IL12B</i>	5q31–q33	—	—	—	—	—	19
<i>DXS1068</i>	—	Xp11.4–p21.1	—	—	—	—	—	4
<i>GCK</i>	<i>GCK</i>	7p	—	—	—	—	—	24
<i>NOS2</i>	<i>NOS2</i>	17q11.2	—	—	—	—	—	13
<i>CD4</i>	<i>CD4</i>	12p12–pter	—	—	—	—	—	—
<i>IL18</i>	<i>IL18</i>	11q22.2–q23.3	—	—	—	—	—	—

<sup>a</sup> В скобках даны значения MLS, полученные в подгруппах семей. Разделение по генотипам MHC и VNTR гена *INS*.

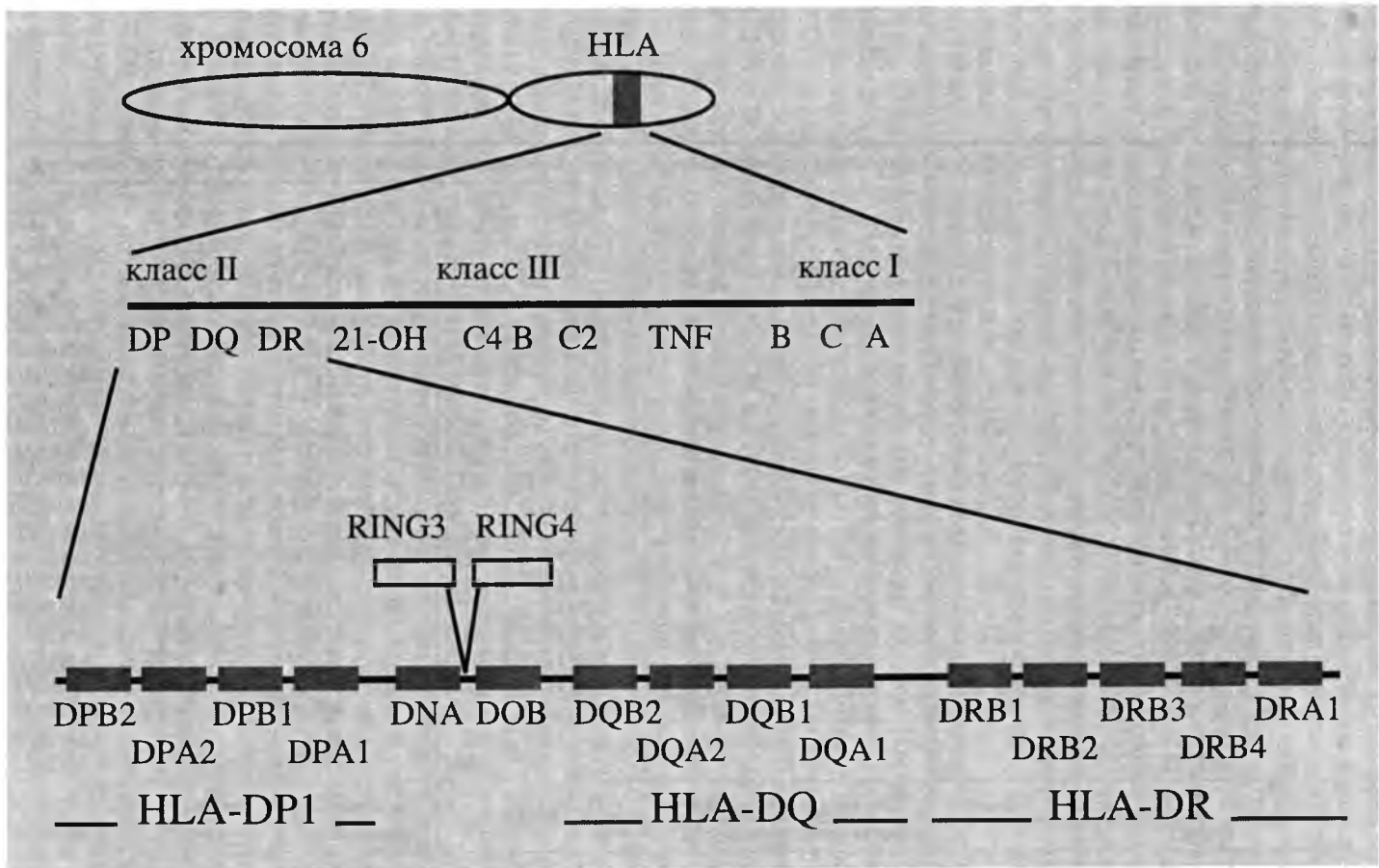


Рис. 78. Структурная организация локуса *MHC* (главного комплекса гистосовместимости) на хромосоме 6, район бр1.3

лей, существование которых связано с выраженным полиморфизмом нуклеотидных последовательностей 2-х экзонов данных генов. Так, к настоящему моменту известно не менее 19 аллелей гена *DQA1* и 35 аллелей гена *DQB1*.

Интерес к полиморфизму цепи  $DQ\beta$  возник с появлением гипотезы о важной роли аминокислотного остатка в положении 57 белка в обеспечении предрасположенности к СД типа 1. Эта гипотеза была подтверждена данными о различной роли в обеспечении риска развития СД типа 1  $\beta$ -цепей, несущих в положении 57 либо остаток аспарагиновой кислоты (Asp57), либо иной аминокислотный остаток. В предрасположенность к СД типа 1 важный вклад вносит также и полиморфизм  $\alpha$ -цепи, связанный с наличием или отсутствием в положении 52 остатка аргинина (Arg52). Белковые продукты генов *DQA1* и *DQB1* ( $\alpha$ - и  $\beta$ -цепи) вступают друг с другом во взаимодействие, образуя гетеродимеры.

Данные, полученные при изучении русской популяции, близки к результатам по европейским популяциям. Анализ исследованного материала позволяет сделать вывод, что с СД типа 1 ассоциированы аллели гена *DQA1*, кодирующие остаток аргинина в положении 52 (Arg52<sup>+</sup>), и аллели гена *DQB1*, не кодирующие остаток аспарагиновой кислоты в положении 57 (Asp57<sup>-</sup>). Эти аллели условно обозначаются как **предрасполагающие** (S) к развитию СД типа 1, а аллели, кодирующие Arg52<sup>-</sup> и Asp57<sup>+</sup>, как **предохраняющие** (P) от развития СД типа 1.

Однако наиболее высокие оценки риска могут быть получены, если в качестве маркеров рассматриваются не отдельные аллели генов *HLA-DQA1* и *DQB1*, а их комбинации, включающие все четыре аллеля двух хромосом. Распределение всех возможных комбинаций в группах больных СД типа 1 и здоровых индивидов из русской популяции г. Москвы представлено в табл. 24.

Частота комбинации с четырьмя предрасполагающими аллелями (SS/SS) у больных СД составляла 52% против 4% в контрольной группе ( $OR = 23,1$  при  $p < 0,001$ ). Генотипы, состоящие из трех предрасполагающих и одного предохраняющего аллелей, можно разделить на две подгруппы. Когда представлен гено-

Таблица 24

Распределение комбинаций предрасполагающих (S) и предохраняющих (P) аллелей генов *HLA-DQA1/B1* в группах больных СД типа 1 и здоровых индивидов из русской популяции г. Москвы

Аллели генов		Число «диабетогенных» гетеродимеров	Больные СД типа 1 (n = 113)	Здоровые (n = 11)	OR	p
<i>DQA1</i>	<i>DQB1</i>					
SS	SS	4	0,52	0,04	23,12	<0,001
SP	SS	2	0,23	0,08	3,1	<0,005
SS	SP	2	0,16	0,12	—	<0,05
SP	SP	1	0,07	0,20	0,32	<0,01
PP	SS	0	0,01	0,07	0,16	<0,05
SS	PP	0	0,01	0,08	0,14	<0,025
PP	SP	0	0	0,17	0,02	<0,001
SP	PP	0	0	0,16	0,02	<0,001
PP	PP	0	0	0,08	0,04	<0,001



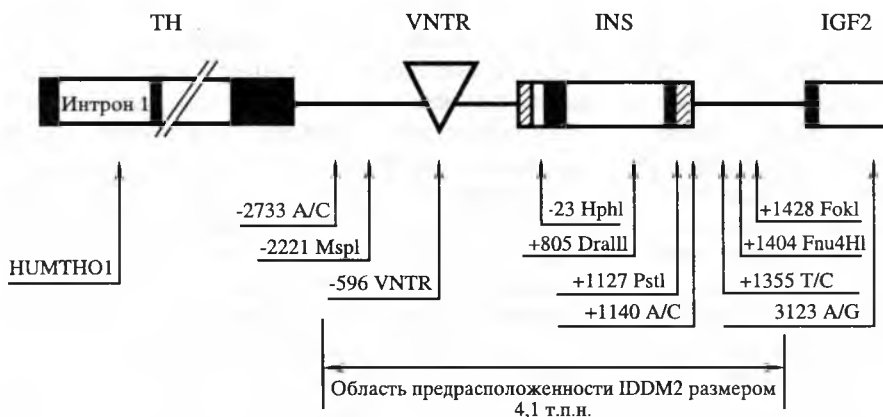
тип SS гена *DQB1*, а SP – гена *DQA1*, то соответствующие сочетания встречаются у больных достоверно чаще ( $OR = 3,1$  при  $p < 0,005$ ), чем в случае комбинации SS гена *DQA1* и SP гена *DQB1*. Последние генотипы также представлены чаще среди больных, однако не достигают статистически значимых уровней. Таким образом, имеющиеся данные позволяют предполагать, что большую роль в развитии заболевания играют аллели гена *HLA-DQB1*, кодирующие остаток Asp57.

Из табл. 24 видно, что среди больных резко снижена частота комбинаций из двух предрасполагающих и двух предохраняющих аллелей (всего два человека). Совсем не обнаружено индивидов с одним предрасполагающим и тремя предохраняющими аллелями, так же как и с четырьмя предохраняющими аллелями, в то время как в контрольной группе частота таких комбинаций составляет 56% ( $OR = 0,02 - 0,16$  при  $p < 0,05$ ). При расчете абсолютного риска ( $R$ ) развития СД типа 1, который является наиболее объективным показателем значения генетического маркера в прогнозировании заболевания, нами было показано, что в русской популяции абсолютный риск развития СД типа 1 у носителей четырех предрасполагающих аллелей составляет 2,54, что в 13 раз выше риска, рассчитанного нами для популяции г. Москвы. Для носителей трех предрасполагающих аллелей абсолютный риск составил 0,4, а для всех остальных людей – ниже 0,05.

Помимо генов *HLA-DQ*, в предрасположенность к СД типа 1 вовлечены и другие гены главного комплекса гистосовместимости. Из-за сильного неравновесия по сцеплению трудно оценить вклад каждого отдельного гена (см. рис. 78). Тем не менее, для крайне полиморфного гена *DRB1* (198 аллелей), относящегося к классу II, четко охарактеризованы аллели предрасположенности и устойчивости к СД типа 1. У европейцев к СД типа 1 предрасполагают некоторые из аллелей *DRB1\*04* и *\*17(03)*, тогда как в азиатских популяциях подобная роль показана лишь для некоторых из аллелей *\*04*. Защитное действие оказывают аллели *DRB1\*07*, *\*11* и *\*15*.

Совсем недавно появилась работа, в которой обнаружен вклад в предрасположенность к СД типа 1 еще одного гена, относящегося к генам *MHC* класса II, а именно, гена *HLA-DPB1*. Для прямого сравнения вклада аллелей этого гена в относительную предрасположенность к СД типа 1 были использованы 408 семей: из Сардинии – 200 и Великобритании – 208. Даже на фоне выраженного неравновесия по сцеплению удалось обнаружить вклад этого гена в предрасположенность к СД типа 1. Этот вклад сравнительно невелик и выражается, главным образом, в предохраняющей роли аллеля *DPB1\*0402*, проявляющейся в комбинации с гаплотипами, не относящимися к гаплотипу DR4. Таким образом, можно сделать вывод, что за основную часть предрасположенности к СД типа 1, определяемую локусом *IDDM1*, несут ответственность широко распространенные аллельные варианты генов *HLA-DRB1*, *DQA1*, *DQB1* и *DPB1*.

**Локус *IDDM2*.** Этот локус, определяющий предрасположенность к СД типа 1, отождествляется с геном инсулина (*INS*), который расположен на хромосоме 11 в районе 11p15.5. В различных популяциях *IDDM2* определяет от 5 до 15% семейного риска развития СД типа 1. Ген *INS* расположен между генами тирозингидроксилазы (*TH*) и инсулиноподобного фактора роста II (*IGF2*). Область предрасположенности *IDDM2* имеет длину 4,1 т.п.н., содержит собственно ген *INS* и полиморфный минисателлит, расположенный в 5'-концевой части этого гена, который обозначается обычно 5'-VNTR (рис. 79).



**Рис. 79.** Структурная организация локуса *IDDM2* и прилежащих к нему генов

Границы области сцепления с СД типа 1 выделены стрелками. Полиморфные участки приведены в нижней части рисунка. Их положение в парах оснований (за исключением полиморфного участка 3123 A/G в правой части) обозначено относительно первого нуклеотида стартового кодона ATG (+1) гена *INS*. Треугольником выделен 5'-VNTR гена *INS*. Заштрихованы нетранслируемые области. Интроны (некодирующие области генов) обозначены белыми прямоугольниками; экзоны (кодирующие участки) окрашены черным цветом

5'-VNTR гена *INS* был впервые описан в 1981 г. Он состоит из тандемно повторяющихся единиц размером 14–15 п.н. с консенсусной последовательностью ACAGGGGTGTGGGG. Число повторяющихся единиц в составе VNTR может изменяться от 26 до 200 (и более). В зависимости от их числа аллели VNTR подразделяют на три класса. Аллели класса I содержат от 26 до 63 повторяющихся единиц, аллели класса III включают от 141 до 209 звеньев. Промежуточный по длине класс II редко встречается у европейцев и состоит из аллелей, содержащих около 80 тандемных повторов.

Исследования в европейских популяциях обнаружили достоверное увеличение частоты встречаемости гомозиготных генотипов класса I у больных СД типа 1 по сравнению со здоровыми людьми, что свидетельствует об ассоциации 5'-VNTR с диабетом этого типа. При этом гомозиготный генотип VNTR класса I выступает в качестве генетического фактора риска развития патологии. Анализ семей, имеющих хотя бы одного гетерозиготного родителя, выявил повышенную частоту передачи предрасполагающих аллелей класса I детям, больным СД типа 1, что дополнительно подтверждает связь между локусом *INS* и заболеванием.

Значительный интерес вызывает тот факт, что в разных популяциях частоты передачи аллелей класса I от отцов и матерей, гетерозиготных по аллелям 5'-VNTR гена *INS* (носители аллелей класса I и III), детям, больным СД типа 1, значительно отличаются. Так, при анализе семей из Франции и США было показано, что больные СД типа 1 дети значительно чаще наследуют аллели класса I от отцов, чем от матерей. Наиболее вероятно, что это связано с импринтингом. В этом случае, даже предрасполагающие аллели, наследуемые от матери, не предрасполагают к развитию заболевания, так как они не экспрессируются в тканях ребенка. Обратная ситуация обнаружена в семьях, происходящих из Великобри-

тании, Дании и Сардинии. В этих популяциях аллели класса I 5'-VNTR гена *INS* наследуются существенно чаще от матерей. То есть в наследовании аллелей 5'-VNTR гена *INS* прослеживается значительная популяционная гетерогенность.

Популяционная гетерогенность обнаружена и при полных геномных поисках как «первого», так и «второго поколений» [Davies et al., 1994; Mein et al., 1998; Concannon et al., 1998], подтвердивших сцепление полиморфного 5'-VNTR гена *INS* с СД типа I. Однако величина MLS в двух изученных популяциях значительно различалась. В коллекции семей из Великобритании (UK356, см. табл. 23) MLS равна 2,8 [Mein et al., 1998], в то время как в коллекции семей из Великобритании и США (US/UK679, см. табл. 23) MLS — только 0,6 [Concannon et al., 1998]. Несомненно, причиной этих отличий является геномный импринтинг в данной области хромосомы 11, который в этих популяциях связан в одном случае с отцом, а в другом — матерью.

По всей видимости, локусы *IDDM1* и *IDDM2* взаимодействуют друг с другом через продукты экспрессии, участвующие в одних и тех же или перекрывающихся физиологических путях, нарушение которых приводит к развитию СД типа I. Накоплено достаточно данных о корреляции между аллелями 5'-VNTR гена *INS*, уровнем синтеза мРНК проинсулина и секрецией продукта этого гена в клетках поджелудочной железы и тимуса. У носителей аллелей класса I уровень синтеза мРНК проинсулина в клетках поджелудочной железы в 1,5–2 раза превышает аналогичные показатели у носителей аллелей класса III. Обратная ситуация в случае клеток тимуса. У носителей аллелей класса III уровень синтеза мРНК проинсулина в два–три раза превышает аналогичные показатели у носителей аллелей класса I. На основании этих данных было выдвинуто предположение, что повышенная экспрессия проинсулина в клетках тимуса способствует установлению полной иммунной толерантности. В то же время пониженная экспрессия проинсулина приводит к нарушениям этого процесса, полная толерантность не устанавливается, часть аутореактивных Т-клеток сохраняется, они уходят на периферию и могут приводить к развитию аутоиммунного СД типа I.

**Локус *IDDM3*.** Впервые о сцеплении локуса *IDDM3*, расположенного на хромосоме 15 в районе 15q26, с СД типа I сообщено в работе Филд и соавт. [Field et al., 1994]. Для картирования этого локуса исследовали три семьи, однако только объединение данных по сцеплению, полученных во всех трех группах, позволило выявить значительное сцепление маркеров *D15S87* и *D15S108* с диабетом типа I (MLS = 2,5). Интересно отметить, что более сильное сцепление маркера *D15S108* обнаружено в подгруппе семей с низкой предрасположенностью к СД типа I по локусу *HLA*, чем в группе семей с высокой предрасположенностью [Field et al., 1994]. Эти данные позволили авторам высказать предположение, что *IDDM3* может относиться к генам, влияющим на предрасположенность к СД типа I независимо от *IDDM1*, возможно, имеющим большую роль в тех семьях, где гены *HLA* представлены слабо предрасполагающими гаплотипами.

Сцепление этой области хромосомы 15 с СД типа I подтверждено в работе Луо и соавт. [Luo et al., 1995], которые в результате обследования 104 семей получили значения MLS, превышающие 1,0 для четырех маркеров в этой области: *D15S230*, *D15S533*, *D15S108* и *D15S120*. Из них максимальная величина MLS (1,7) обнаружена для микросателлита *D15S108*, что подтверждало сцепление данного маркера с СД типа I. Однако расширение числа семей до 265 привело к значительному снижению значения MLS (до 0,2). Полные геномные поиски «второго поколе-

ния», проведенные двумя другими группами исследователей [Mein et al., 1998; Concannon et al., 1998], не подтвердили сцепления этого локуса с СД типа 1 ( $MLS = 0$ , см. табл. 23). Для подтверждения сцепления локуса *IDDM3* с СД типа 1 необходимо проведение дополнительных исследований с использованием большого количества семей, возможно, из различных и достаточно гомогенных популяций.

**Локус *IDDM4*.** Это один из наиболее изученных локусов картирован на хромосоме 11 (11q13) [Davies et al., 1994; Hashimoto et al., 1994]. В этих первых работах показано, что область сцепления с СД типа 1 охватывает участок хромосомы длиной около 14 сМ, включающий ген *FGF3*, который кодирует фактор роста фибробластов, между маркерами *D11S1253* и *D11S1314*, причем для четырех из 9-ти полиморфных микросателлитов, использованных для картирования *IDDM4*, получены величины  $MLS$  выше 1,0 [Davies et al., 1994]. Наивысшее значение  $MLS$  (3,4) обнаружено для полиморфного маркера в гене *FGF3* [Davies et al., 1994; Hashimoto et al., 1994], а значение  $\lambda_s$ , вычисленное с использованием ядерных семей из Великобритании, для локуса *IDDM4* составляет 1,07, что соответствует 7,1% семейной ассоциации с СД типа 1 (см. табл. 21). *IDDM4* находится на расстоянии 70 сМ от гена *INS* (локус *IDDM2*) и не исключено, что имеет место некоторое генетическое взаимодействие между этими локусами.

Результаты исследований по сцеплению были подтверждены в работах [Luo et al., 1995], где получены значения  $MLS = 1,8$  для маркера *D11S1337*, а затем и для маркера *D11S1296* ( $MLS = 3,9$ ), расположенного рядом с *D11S1337* [Luo et al., 1996]. Детальное картирование этой области генома длиной 15 сМ, проведенное на 707 семьях с конкордантными сибсами (18 маркеров) из различных европейских популяций, позволило выявить область максимального сцепления рядом с маркером *D11S1337* ( $MLS = 2,7$ ) и группу маркеров с  $MLS \geq 0,7$ .

Несколько генов-кандидатов расположено в этой области хромосомы 11. Для части генов, к которым относятся гены *FGF3*, *FADD* и ген галанина (*GALN*), уже показано отсутствие сцепления с СД типа 1. Для того чтобы выявить гены-кандидаты для локуса *IDDM4* был сконструирован контиг длиной 400 т.п.н., и для всех клонированных фрагментов ДНК, входящих в его состав, определены нуклеотидные последовательности. Удалось идентифицировать несколько генов, одним из которых является ген *LRP5* (low-density lipoprotein receptor-related protein 5), расположенный на расстоянии 3 т.п.н. от маркера *H0570*. Кроме того, три других гена были обнаружены в этой области генома: гены *CGI-85*, *C11orf24* и *C11orf23*. Идентификация этих генов открывает новые возможности для отождествления локуса *IDDM4* с конкретным геном [Mein et al., 1998].

**Локус *IDDM5*.** Уже в первой работе по полному геномному поиску наряду с локусом *IDDM1* (HLA) на хромосоме 6 были обнаружены две другие независимые области сцепления с СД типа 1 [Davies et al., 1994]. Эти локусы получили обозначения *IDDM5* и *IDDM8*. В двух работах [Luo et al., 1995; 1996] эти данные были подтверждены, причем величина  $MLS$  для локуса *IDDM5*, определенная в этих работах, составила 4,5. Параллельно, другие исследователи провели детальное картирование области хромосомы 6, включающей оба эти локуса, и показали, что, действительно, эти локусы независимы и находятся на расстоянии 28 сМ друг от друга [Davies et al., 1996]. Локус *IDDM5* находится рядом с геном *ESR*,  $MLS$  этого локуса равен 1,95, а  $\lambda_s = 1,15$ , что соответствует 7,7% семейной ассоциации с СД типа 1. Полные геномные поиски, проведенные двумя другими груп-

пами исследователей [Mein et al., 1998; Concannon et al., 1998], также подтвердили сцепление этого локуса с СД типа 1 (см. табл. 22).

Использование метода TDT показало, что из всех маркеров только для *a046xa9* наблюдается неравновесная передача аллелей. Аллель 8 маркера *a046xa9* передавался существенно чаще больным сибсам в семьях из Великобритании и США. Общий анализ полученных данных позволяет сделать вывод, что наличие в этой области хромосомы 6 гена, предрасполагающего к СД типа 1, можно считать доказанным.

**Локус IDDM6.** В первом полном геномном поиске [Davies et al., 1994] обнаружено сцепление маркера *D18S64*, расположенного на хромосоме 18, с СД типа 1 (MLS = 1,1) и данный локус получил обозначение *IDDM6*. Для этой области генома разработаны 12 новых полиморфных микросателлитов, использование которых позволило подтвердить сцепление этой области с СД типа 1 в результате обследования 195 ядерных семей из Великобритании.

По методу ETDT только для маркера *D18S487* обнаружена повышенная частота передачи аллеля четырем сибсам, больным СД типа 1. Далее было изучено распределение только тех аллелей маркеров *A181,2* и *I043,56*, которые находились в неравновесии по сцеплению с аллелем 4 маркера *D18S487*, и установлено, что аллель 2 маркера *A181,2* показал более выраженное сцепление с СД типа 1, чем аллели маркеров *I043,56* и *D18S487*. Однако при изучении дополнительных коллекций семей из шести разных регионов (всего 390 европейских семей) по методу ETDT обнаружено отсутствие неравновесной передачи аллеля 2 маркера *A181,2* во всех группах семей. В связи с этим было высказано предположение, что отсутствие ассоциации с СД типа 1 аллеля 2 маркера *A181,2* связано с наличием в изученных коллекциях семей дополнительных диабетогенных гаплотипов, не содержащих аллеля 2.

По всей видимости, данное противоречие является следствием того, что в отдельных популяциях «прародительские» хромосомы могут нести различные аллели микросателлитного маркера (эффект основателя), что, собственно говоря, и мешает выявлению индивидуальных аллельных ассоциаций. Для того чтобы преодолеть это противоречие, был разработан новый подход, основанный на анализе частот передачи гаплотипов нескольких полиморфных маркеров, а не аллелей одного маркера. Наиболее вероятная структура этого участка прародительской хромосомы была реконструирована при анализе неравновесия по сцеплению между предварительно установленным гаплотипом трех маркеров *A181,2-D18S487-I043,56* и каждым из следующих маркеров, расположенных в этой области хромосомы 18. В результате была доказана выраженная ассоциация маркера *D18S487* с СД типа 1.

Проведение детального анализа ортологичных областей хромосом человека, мыши и крысы показало, что эти области хромосом мыши и крысы также сцеплены с экспериментальным диабетом типа 1, причем порядок генов во всех трех ортологичных областях консервативен. Кроме того, показано, что данная область сцеплена с рядом аутоиммунных заболеваний у человека и экспериментальных животных, что позволило перейти к поиску гена-кандидата. В настоящее время в качестве гена-кандидата рассматривается ген *DCC* (deleted in colorectal carcinoma), так как продукт этого гена участвует в апоптозе. Известно, что нарушения процесса апоптоза могут приводить к развитию аутоиммунных забо-

леванний. Использование двух полиморфных микросателлитных маркеров, обнаруженных в интронах гена *DCC*, позволило провести анализ ассоциации четырех наиболее часто встречающихся гаплотипов этих маркеров с тремя аутоиммунными заболеваниями: СД типа 1, множественным склерозом (МС) и ревматоидным артритом (РА). Только для гаплотипа 2-10 была обнаружена положительная ассоциация с СД типа 1 и МС, однако в случае РА различия в наследовании этого гаплотипа не достигали статистически достоверного уровня.

В заключение можно сказать, что изучение локуса предрасположенности к СД типа 1 на хромосоме 18 (18q21) позволяет сделать несколько важных выводов. Во-первых, было обнаружено, что «прародительские» хромосомы могут нести различные аллели микросателлитного маркера в отдельных популяциях (эффект основателя) и мешать выявлению индивидуальных аллельных ассоциаций. Во-вторых, показана важность выявления и анализа ортологичных областей хромосом человека и животных моделей для анализа сцепления ортологичных областей с заболеванием. И, в-третьих, показано, что, по всей видимости, локус *IDDM6* содержит общий ген, предрасполагающий к развитию многих аутоиммунных заболеваний.

**Локус *IDDM7*.** Для нескольких локусов, расположенных на хромосоме 2 в районе 2q31-q33, обнаружено сцепление с СД типа 1. Одним из этих локусов является *IDDM7*. Его положение впервые было установлено авторами [Soreman et al., 1995], изучившими сцепление и неравновесие по сцеплению для 21 микросателлитного маркера с использованием 348 ядерных семей и 108 семей с дискордантными sibсами. *IDDM7* был картирован около маркера *D2S152* внутри интервала 2 сМ (MLS = 1,3 и  $\lambda_s = 1,13$ ). Параллельно, в этой же области генома было обнаружено сцепление нескольких маркеров, расположенных вокруг гена *HOXD8*, находящегося на расстоянии ~5 сМ от маркера *D2S152*. Наибольшая величина MLS равнялась 4,8 и была получена для маркера *HOXD8*. Известно, что область 2q31 гомологична одной из областей хромосомы 1 мыши, содержащей ген *idd5*. Возможно, гены *IDDM7* человека и *idd5* мыши гомологичны.

Однако в работе [Luo et al., 1996], выполненной на независимой группе семей, сцепление данной области с СД типа 1 и неравновесие по сцеплению между маркером *D2S152* и *IDDM7* подтверждено не было. Несколько позже проведено еще два полных геномных поиска «второго поколения» [Mein et al., 1998; Concannon et al., 1998], в которых для локуса *IDDM7* получены значения MLS равные 1,5 и 0,7 (см. табл.). Использование TDT и 8-ми коллекций семей из разных стран также не позволило подтвердить неравновесную передачу аллеля 228 маркера *D2S152* ни больным, ни здоровым sibсам. В настоящее время не ясно, существует ли в данной области генома ген, предрасполагающий к СД типа 1. Возможно, что для решения этого вопроса необходимо использовать значительно большее число ядерных семей, так как влияние этого предполагаемого гена на развитие СД типа 1 может быть очень слабым.

**Локус *IDDM8*.** Как уже упоминалось, наряду с локусом *IDDM1* (*HLA*) на хромосоме 6 еще в первом полном геномном поиске обнаружены две другие независимые области сцепления с диабетом типа 1: *IDDM5* и *IDDM8* [Davies et al., 1994]. В двух работах [Luo et al., 1995; 1996] эти данные были подтверждены, причем величина MLS для локуса *IDDM8* составила 3,6. Параллельно, другие исследователи провели детальное картирование области хромосомы 6, включающей оба эти

локуса, и показали, что, действительно, эти локусы независимы и находятся на расстоянии 28 сМ друг от друга. Лocus *IDDM8* находится рядом с маркером *D6S281* и *MLS* этого локуса равна 2,57, а  $\lambda_s = 1,17$ , что соответствует 7,8% семейной ассоциации с СД типа 1 [Davies et al., 1994]. Полные геномные поиски «второго поколения», проведенные двумя другими группами исследователей [Mein et al., 1998; Concannon et al., 1998], также подтвердили сцепление этого локуса с СД типа 1 (см. табл.).

Методом ETDT было показано, что из всех маркеров только для маркера *D6S281* наблюдается неравновесная передача аллелей. Аллель 4 маркера *D6S281* передавался существенно чаще больным сибсам в семьях из Великобритании, но картина была обратной при анализе семей из США. По всей видимости, как и в случае ряда маркеров локуса *IDDM6*, различия связаны с разным этническим происхождением данных популяций, а также уровнем смешения внутри них. Общий анализ полученных данных позволил сделать вывод, что наличие рядом с маркером *D6S281* гена, предрасполагающего к СД типа 1, можно считать доказанным. Для идентификации этого гена в области, окружающей маркер *D6S281*, необходимо было проведение детального анализа сцепления и ассоциации новой группы полиморфных маркеров с использованием большого количества семей.

Проведение такого анализа стало возможным благодаря тому, что для этой области ранее были описаны дрожжевые, бактериальные и космидные векторы, содержащие фрагменты ДНК теломеры и прилежащих районов хромосомы 6, а также благодаря наличию данных о нуклеотидных последовательностях этих областей. В дополнение к пяти, ранее описанным в данной области микросателлитам, Овербаху [Owerbach., 2000] удалось идентифицировать еще три новых маркера в базе данных нуклеотидных последовательностей и два других в клонированных ДНК космид. Комплексное использование всех этих данных позволило создать физическую карту фрагмента ДНК длиной 842 т.п.н., начинающегося от теломеры хромосомы 6.

Создание карты, отражающей уровень неравновесия по сцеплению между гаплотипами, и использование метода TDT позволило установить положение локуса *IDDM8*. Он находится внутри фрагмента ДНК длиной 200 т.п.н., расположенного между теломерой и маркером *M122K* [Owerbach., 2000]. Гены *D12280*, *stSG6383*, *WI-11654*, *TBP* и *HC5* уже идентифицированы в этой области хромосомы 6 и могут рассматриваться в качестве генов-кандидатов.

**Лocus *IDDM9*.** Этот locus картирован на хромосоме 3q21-q25 еще в первой работе по полному геномному поиску [Davies et al., 1994]. Величина *MLS* равнялась 1,9 при  $\lambda_s = 1,17$  (см. табл. 23), что соответствует 8,4% семейной ассоциации [Davies et al., 1994]. В трех последующих работах по геномному поиску «второго поколения» [Luo et al., 1996; Mein et al., 1998; Concannon et al., 1998] получены существенно более низкие значения *MLS* (от 0,2 до 1,1). Однако после разделения семей на подгруппы по генотипам локуса *IDDM1: DR3/DR4, DR4/X (X ≠ DR3) и DR3/Y (Y ≠ DR4)*, для подгруппы с генотипом *DR3/DR4* наблюдалась более высокая величина *MLS* – 2,4 [Mein et al., 1998]. Использование варианта разбивки на подгруппы в зависимости от пола сибсов (FF, MM и FM) показало, что в случае маркера *D3S1279* имеет место значительно более частая передача одинаковых аллелей в подгруппе FF, притом достоверно чаще от матерей.

При полном геномном поиске в семьях с ревматоидным артритом (РА) в области 3q13 обнаружили локус, предрасполагающий к РА, и высказали предположение, что он может быть идентичен *IDDM9*. Однако более детальный анализ, учитывающий сцепление между локусами, которое зависит от пола, показал, что, скорее всего, это два различных локуса, расположенных на расстоянии около 30 сМ друг от друга.

Анализ сцепления локуса *IDDM9*, проведенный на ядерных семьях (33) и семьях с дискордантными сибсами (65) из русской популяции [Носиков и соавт., 2002], показал сцепление маркеров *D3S1769* и *D3S4015* как в ядерных семьях ( $MLS = 1,73$  и  $1,93$ ), так и в семьях с дискордантными сибсами ( $p < 0,02$ ). Однако в настоящий момент вряд ли можно считать абсолютно доказанным, что локус *IDDM9* содержит ген, предрасполагающий к СД типа 1. Для решения этого вопроса необходимо проведение детального анализа сцепления и ассоциации с СД типа 1 группы полиморфных маркеров с использованием большого количества семей. При этом следует учитывать, что частоты наследования аллелей полиморфных маркеров локуса *IDDM9* зависят от генотипов локуса *IDDM1* [Mein et al., 1998], а также от пола сибсов и родителей.

**Локус *IDDM10*.** В прицентромержной области хромосомы 10 (10p11-q11) между маркерами *D10S197* и *D10S220* область сцепления с СД типа 1 обнаружена еще в первой работе по полному геномному поиску, причем наибольший  $MLS$  (1,3) был у маркера *D10S193* [Davies et al., 1994]. В последующей работе Рида и соавт. [Reed et al., 1997], выполненной также в лаборатории Дж. Тодда с использованием 25-ти полиморфных маркеров, подтверждено сцепление этой области с СД типа 1 и данный локус получил обозначение *IDDM10*. В последующей работе по геномному поиску «второго поколения» [Mein et al., 1998], проведенной на семьях из Великобритании, получено подтверждение сцепления и очень высокое значение  $MLS = 4,7$ .

Однако в двух других работах, проведенных на материале семей из США и Великобритании [Concannon et al., 1998], и семей из различных регионов США и континентальной Италии [Luo et al., 1996] были получены существенно более низкие значения  $MLS$  (0,4 и 0,2, соответственно). Анализ сцепления локуса *IDDM10* [Носиков и соавт., 2002], проведенный в результате обследования ядерных семей (33) и семей с дискордантными сибсами (65) из русской популяции, обнаружил сцепление маркеров *D10S1243* и *D10S2326* с СД типа 1 как в ядерных семьях ( $MLS = 3,20$  и  $1,62$ ), так и в семьях с дискордантными сибсами ( $p < 0,0001$  и  $0,02$ ).

Анализ (по методу TDT), проведенный на 1169 семьях из пяти разных стран, показал достоверное сцепление ( $p = 0,006$ ) маркера *D10S193* с СД типа 1 [Owerbach, 2000]. Интересно отметить, что анализ наследования аллелей, выполненный на материале большой группы ядерных семей (356), с использованием ряда маркеров, расположенных в локусе *IDDM10*, выявил значительно более частую передачу одинаковых аллелей больным диабетом сибсам от матерей. Анализ всех полученных данных показывает, что сцепление этого локуса с СД типа 1 можно считать доказанным. Величина  $\lambda_s$  равняется 1,56 (см. табл. 23), что соответствует 10,4% семейной ассоциации [Mein et al., 1998]. По всей видимости, по величине вклада в генетическую предрасположенность это второй или третий локус после локуса *IDDM1* в популяции Великобритании [Mein et al., 1998].



**Локус *IDDM11*.** Сцепление с СД типа 1 локуса, обозначенного *IDDM11* и расположенного на хромосоме 14 (14q24.3–q31), обнаружено при анализе сцепления микросателлита *D14S67*, причем величина MLS была найдена равной 3,83 [Field, 1996]. Интересно отметить, что величина MLS больше в подгруппе семей, для которых наследование одинаковых гаплотипов *HLA* составляет менее 50% [Field, 1996]. Эти данные позволяют предположить, что *IDDM11* может относиться к генам, которые влияют на предрасположенность к СД типа 1 независимо от *IDDM1*, возможно, играя большую роль в тех семьях, где гены *HLA* представлены слабо предрасполагающими гаплотипами.

В другой работе [Luo et al., 1996] в этом районе обнаружено незначительное сцепление (MLS = 1,0). Полные геномные поиски «второго поколения», проведенные двумя группами исследователей [Mein et al., 1998; Concannon et al., 1998], не подтвердили сцепления этого локуса с СД типа 1 (MLS = 0). Так, в работе Мейна и соавт. [Mein et al., 1998] сцепления маркеров *D14S67* и *D14S68* с СД типа 1 не выявлено, однако рядом на той же хромосоме 14 обнаружено сцепление для области, где расположены маркеры *D14S70–D14S276*, находящиеся в 33 сМ проксимальнее *IDDM11* (14q12–q21). Для подтверждения сцепления локуса *IDDM11* с СД типа 1 необходимо проведение дополнительных исследований большого количества семей, возможно, из разных популяций.

**Локус *IDDM12*** — один из наиболее изученных локусов. Его положение на хромосоме 2 (2q33) впервые установлено в 1996 г. [Nistico et al., 1996] при анализе сцепления с СД типа 1 группы полиморфных маркеров, расположенных около генов *CTLA4* и *CD28*. Эти гены рассматривались в качестве кандидатов, так как, во-первых, структурная организация этой области генома человека подобна области, содержащей локус *idd5*, хромосомы 1 мыши, для которой показано, что она вовлечена в развитие диабета у мышей линии NOD, и, во-вторых, гены *CTLA4* и *CD28* кодируют поверхностные рецепторы Т-клеток и играют важную роль в их пролиферации.

Анализ сцепления области 2q33 с СД типа 1, выполненный на материале 48 ядерных семей из Италии, показал, что максимальное сцепление (MLS = 3,39 и  $\lambda_s = 3,57$ ) имеет место для области *D2S72-CTLA4-D2S116*, включающей микросателлит (АТ)<sub>n</sub>, который расположен в 3'-нетранслируемой области гена *CTLA4* [Nistico et al., 1996]. Следует отметить, что была обнаружена неравновесная передача большим sibсам аллеля этого микросателлита длиной 104 п.н. Исходя из того, что ген *CTLA4* может быть одним из наиболее вероятных генов-кандидатов, предрасполагающих к СД типа 1, те же авторы предложили новый полиморфный маркер *Thr17Ala*, расположенный в лидерном пептиде CTLA-4 и происходящий от одонуклеотидного полиморфизма (А/Г) в положении 49 экзона 1 (*A49G*).

Анализ с помощью метода TDT, выполненный на пяти коллекциях семей из разных стран, показал преимущественную передачу аллеля *G* большим sibсам из Италии ( $p = 0,004$ ), Испании ( $p = 0,004$ ) и, частично, США ( $p = 0,074$ ). Однако в случае семей из Великобритании и Сардинии преимущественной передачи аллеля *G* не обнаружено. Чтобы исключить возможность ложно-положительных результатов, был проведен анализ ассоциации аллеля *G* с СД типа 1 с использованием данных большой группы пациентов из Бельгии. Частота аллеля *G* была существенно выше в группе пациентов с СД типа 1, чем в группе здоровых инди-

видов. Наиболее логичное объяснение этому факту предложено авторами, и заключается в том, что, в отличие от средиземноморских популяций, не во всех популяциях существует неравновесие по сцеплению между аллелем *G* гена *CTLA4* или аллелем 104 н.п. полиморфного микросателлита в 3'-нетранслируемой области этого гена и этиологическим вариантом, определяющим предрасположенность к СД типа 1 [Nistico et al., 1996].

Для более точной локализации локуса *IDDM12* в геномном интервале, включающем гены *CD28* и *CTLA4*, сконструирована физическая карта. На участке хромосомы 2 длиной около 300 т.п.н., установлено взаимное положение 10-ти полиморфных маркеров: *D2S346*, *CD28*, *GGAA19E07*, *D2S307*, *D2S72*, *CTLA4* (три маркера), *D2S105* и *GATA52A04*. Для этой цели использовали STS, а также дрожжевые, бактериальные и вирусные векторы, содержащие фрагменты ДНК из этой области генома.

Проведенный по методу TDT анализ данных о распределении аллелей полиморфных маркеров в полиэтнической коллекции семей из США (европейцы и мексиканцы), Франции, Испании, Китая и Кореи, содержащей 178 дискордантных и 350 ядерных семей, позволил выявить статистически значимые ассоциацию и сцепление с СД типа 1 трех маркеров внутри гена *CTLA4* и двух маркеров (*D2S72* и *D2S105*), непосредственно прилежащих к гену *CTLA4* с обеих сторон. Однако никакой ассоциации и сцепления не было обнаружено для более удаленных маркеров, включая и маркеры внутри гена-кандидата *CD28*. Дополнительный анализ методом Тsr выявил статистически значимую ассоциацию СД типа 1 только с тремя маркерами внутри гена *CTLA4*. Таким образом, проведенный анализ позволяет утверждать, что локус *IDDM12* расположен внутри фрагмента ДНК длиной 100 т.п.н., и данный локус может быть отождествлен либо с геном *CTLA4*, либо с неизвестным геном, расположенным очень близко к *CTLA4*.

Таким образом, сцепление *IDDM12* с СД типа 1 практически доказано. Средняя величина  $\lambda_s$  равняется 1,61 (см. табл. 23), что соответствует 10,7% семейной ассоциации [Nistico et al., 1996]. Следует также отметить, что *IDDM12* определяет предрасположенность не только к СД типа 1, но и к таким аутоиммунным заболеваниям как диффузно-токсический зоб (ДТЗ), аутоиммунный тиреоидит и целиакия. По всей видимости, локус *IDDM12*, наряду с локусами *IDDM1* и *IDDM6*, содержит общий ген, возможно, ген *CTLA4*, предрасполагающий к развитию многих аутоиммунных заболеваний.

**Локус *IDDM13*.** Как уже упоминалось, для нескольких локусов, расположенных на хромосоме 2 (2q31-q34), обнаружено сцепление с СД типа 1. Одним из этих локусов является *IDDM13*. Его положение в области 2q34 на расстоянии около 20 сМ дистально от гена *CTLA4* (локус *IDDM12*) впервые установлено в работе [Morahan et al., 1996], где изучали сцепление нескольких микросателлитных маркеров на коллекции из 115 ядерных семей. Наибольшее сцепление обнаружено для трех расположенных рядом маркеров *D2S164*, *D2S301* и *D2S137*, причем величина MLS равнялась 3,3 при  $\lambda_s = 1,6$  (см. табл. 23), что соответствует 10,7% семейной ассоциации [Morahan et al., 1996]. Дополнительное доказательство существования локуса *IDDM13* в этой зоне хромосомы 2 получено в работе японских исследователей, показавших ассоциацию с СД типа 1 маркера *D2S137*, расположенного на 3 сМ ближе к центромере, чем маркер *D2S164*, в группе больных из японской популяции. Однако в трех последующих работах по геномному по-

иску «второго поколения» [Luo et al., 1996; Mein et al., 1998; Concannon et al., 1998] были получены существенно более низкие значения MLS (от 0 до 0,4).

При анализе (метод TDT) наследования общих аллелей 7 маркеров, расположенных в области размером приблизительно 11 сМ вокруг маркера *D2S164*, в 352 семьях из Великобритании и 94 семьях из США показано, что только в случае маркера *D2S157* наблюдается статистически достоверная неравновесная передача аллеля 180 в обеих группах семей. Сцепление с СД типа 1 обнаружено и при исследовании 254 ядерных семей из датской популяции для маркеров *D2S137–D2S164–D2S1471* с использованием методов TDT и Tsp.

Анализ всех вышеприведенных данных показывает, что существование локуса *IDDM13*, сцепленного с развитием СД типа 1, можно считать практически доказанным, хотя необходимо проведение дополнительных исследований больших групп семей из этнически гомогенных популяций. Как дополнительный аргумент в пользу существования этого локуса может рассматриваться и тот факт, что при полном геномном поиске в семьях с РА в области 2q31–q37 также обнаружено сцепление с этим заболеванием.

**Локус *IDDM15*.** Впервые сцепление маркера *D6S283*, расположенного в области 6q21, с СД типа 1 было обнаружено при анализе 523 ядерных семей из Франции, США и Дании с высокой достоверностью (MLS = 4,2 при  $p = 0,00003$ ) [Delepine et al., 1997]. Локус получил обозначение *IDDM15*, и было показано, что он расположен в 32 сМ от локуса *HLA* (6p21) и отличается от локусов *IDDM5* (6q25) и *IDDM8* (6q27). Авторы [Delepine et al., 1997] разработали новый статистический метод, который позволил изучить сцепление с СД типа 1 2-го локуса в присутствии ранее установленного 1-го локуса (в данном случае *HLA*). Сцепление *IDDM15* с СД типа 1 подтверждено в геномных поисках «второго поколения» (MLS > 2,3) при анализе семей из США и Великобритании [Concannon et al., 1998] и Скандинавских стран [European Consortium, 2001]. Однако на баскских семьях сцепление всех трех локусов, расположенных на хромосоме 6 (*IDDM5*, *IDDM8* и *IDDM15*) с СД типа 1 не подтверждено. Величина  $\lambda_s$  для локуса *IDDM15* равняется 1,34 (см. табл. 23), что соответствует 8,9% семейной ассоциации [Delepine et al., 1997].

В настоящий момент сцепление локуса *IDDM15* с СД типа 1 вряд ли можно считать окончательно доказанным. Для решения этого вопроса необходимо проведение дополнительных исследований больших групп ядерных семей из этнически гомогенных популяций. В этой же области генома расположен ген, ответственный за развитие транзиторного неонатального сахарного диабета. В связи с этим высказано предположение, что ген *TNDM*, ответственный за развитие этого заболевания, может рассматриваться в качестве гена-кандидата для локуса *IDDM15*.

**Локус *IDDM16*** — этот локус расположен в хромосомной области 14q32.3 в районе, где расположен кластер генов, кодирующих тяжелые цепи иммуноглобулинов (*IGH*). При анализе распределения аллелей полиморфных микросателлитов в коллекции из 351 ядерной семьи, собранной в Северной Америке и Великобритании, было обнаружено сцепление трех микросателлитов расположенных рядом с кластером генов *IGH*. Но при анализе этнически значительно более гомогенной коллекции из 241 семьи (из них 138 ядерных семей с двумя и более сибсами), собранной в Дании, сцепление с СД типа 1 подтвердить не удалось. Тем не менее,

использование датской коллекции семей позволило обнаружить достоверную ассоциацию локуса *IDDM16* с СД типа 1. В сумме полученные данные позволяют высказать предположение, что в генах кластера *IGH* может располагаться этиологическая мутация, определяющая предрасположенность к СД типа 1. Но в настоящий момент сцепление локуса *IDDM16* с СД типа 1 вряд ли можно считать окончательно доказанным.

**Локус *IDDM17*** обнаружен при геномном поиске сцепления с СД типа 1 в большой семье арабских бедуинов, в составе которой было обнаружено 19 больных с СД типа 1, причем все они являлись носителями гаплотипов *HLA-DR3*, определяющих высокий риск развития СД типа 1 [Verge et al., 1998]. Следует отметить, что эти гаплотипы крайне редко встречались у здоровых членов этой семьи. Локус был картирован в области 10q25. Область максимального сцепления расположена на участке хромосомы длиной около 8 сМ между маркерами *D10S1750* и *D10S1773*. Для двух других микросателлитов *D10S592* и *D10S554*, расположенных рядом с этой областью, было также обнаружено неравновесие по сцеплению с локусом *IDDM17*.

В этой же области расположен ген *FAS* (10q24.1), кодирующий поверхностный рецептор, который играет важную роль в процессе апоптоза. Полиморфный микросателлит (CA)<sub>n</sub>, расположенный на расстоянии 48,5 т.п.н. от гена *FAS*, был использован для поиска ассоциации этого гена в группах больных с СД типа 1 и здоровых индивидов, однако никакой ассоциации с СД типа 1 не обнаружено. В различных районах гена *FAS*, в том числе и в промоторной области, выявлено около 20 различных однонуклеотидных полиморфизмов, которые были использованы для анализа сцепления этого гена с СД типа 1 на материале из коллекции датских семей, однако и в этом случае сцепления с СД типа 1 не наблюдалось [Nolsoe et al., 2002].

Следует отметить, что в большинстве работ по полному геномному поиску не обнаружено сцепления данной области генома с СД типа 1 [Davies et al., 1994; Hashimoto et al., 1994; Mein et al., 1998; Concannon et al., 1998; European Consortium, 2002]. Однако повышенные значения LOD были найдены для этой области хромосомы 10 при объединенном исследовании 767 семей из США и Великобритании [Cox et al., 2001], причем, только для группы семей, в которых все сибсы с СД типа 1 имели генотипы *HLA-DR3/X* ( $X \neq HLA-DR4$ ). Это согласовалось с данными, полученными в исходной работе по анализу большой семьи арабских бедуинов [Verge et al., 1998]. Таким образом, обзор всех сведений, касающихся локуса *IDDM17*, позволил высказать предположение о том, что при некоторых обстоятельствах СД типа 1 может быть отнесен к олиогенным, а не полигенным заболеваниям, и, возможно, только два или три гена определяют предрасположенность к СД типа 1 в семье арабских бедуинов [Verge et al., 1998].

**Локус *IDDM18***. На экспериментальной модели (мышь линии NOD) было показано, что интерлейкин 12 (ИЛ-12) вовлечен в развитие диабета у мышей линии NOD. В связи с этим выглядело вполне логичным изучение ассоциации генов, кодирующих субъединицы этого цитокина. ИЛ-12 состоит из двух субъединиц (p35 и p40), кодируемых двумя разными генами: *IL12A* и *IL12B*. Эти гены расположены на хромосомах 3 и 5, соответственно. В 3'-нетранслируемой области гена *IL12B* был обнаружен однонуклеотидный полиморфный маркер (*C1159A*), который и был использован для анализа сцепления этого гена с СД типа 1 в ядерных

семьях и в семьях с дискордантными сибсами. В обоих случаях было обнаружено неравновесное наследование аллелей и данный локус, расположенный на хромосоме 5q31–q33, получил обозначение *IDDM18* [Morahan et al., 2001].

Данные о сцеплении этого локуса с СД типа 1 подтверждены и в исследовании, проведенном на 364 ядерных семьях европейского происхождения из США, как с использованием маркера *C1159A*, так и маркера *D5S2941*, представляющего собой полиморфный тринуклеотидный микросателлит (АТТ)<sub>n</sub>. Для обоих маркеров методом ЕТDТ показано, что наблюдается статистически достоверная неравновесная передача аллелей. Следует отметить также наличие корреляции между аллелем А маркера *C1159A* и повышенным уровнем экспрессии гена *IL12B* в линиях клеток и периферических лимфоцитах. Авторы высказывают предположение, что повышенный уровень экспрессии ИЛ-12 может ускорять процесс активации Т-клеток и развитие аутоиммунного процесса при СД типа 1, а также и при других аутоиммунных заболеваниях.

Однако в двух других исследованиях, проведенных на группах случай/контроль и ядерных семьях из популяций Италии и Северной Ирландии не обнаружено ассоциации и сцепления с СД типа 1. Только в одном из полных геномных поисков выявлено сцепление двух районов хромосомы 5 (5p15 и 5q34–qter) человека с СД типа 1 [Mein et al., 1998], однако цитогенетическая локализация маркеров *D5S422-D5S429* (5q34–qter) не полностью совпала с положением гена *IL12B* (5q31–q33). При полном геномном поиске в семьях с ревматоидным артритом (РА) в этой же области (5q32–q33) было обнаружено сцепление. Таким образом, в настоящее время сцепление локуса *IDDM18* с СД типа 1 вряд ли можно считать окончательно доказанным. Для решения этого вопроса необходимо проведение дополнительных исследований на больших группах ядерных семей из различных популяций.

**Локус(ы) на хромосоме X.** Внесение ряда модификаций в метод определения MLS, используемый при анализе данных ядерных семей для обнаружения сцепления между аутосомным маркером и заболеванием, позволило провести анализ сцепления группы маркеров, расположенных на хромосоме X с СД типа 1 [Cordell et al., 1995]. Для анализа использовали материал, собранный в 284 ядерных семьях из Великобритании и США в сочетании с 13-ю полиморфными маркерами хромосомы X, и для четырех маркеров было обнаружено сцепление с СД типа 1 [Cordell et al., 1995]. Однако детальный последующий анализ выявил намного более сложную картину. Общепринято, что соотношение мужчины : женщины (М:Ж) среди пациентов с СД типа 1 близко к 1. Но данные, накопленные при изучении разных популяций, показали, что в странах с высокой встречаемостью СД типа 1, главным образом в европейских, значение соотношения М:Ж превышает единицу, в то время как в странах с низкой встречаемостью СД типа 1, преимущественно, в азиатских и африканских, этот параметр меньше единицы.

В работе, выполненной в лаборатории Дж. Толда, была определена величина М:Ж в зависимости от генотипа главного локуса (*MHC; IDDM1*). Известно, что два главных predisposing гаплогруппы (HLA-DR3 и -DR4) локуса *IDDM1* представлены у 95% пациентов европейского происхождения. При анализе 1307 больных, происходящих из популяций со средней встречаемостью СД типа 1 (США, Великобритания и Сардиния), обнаружено, что у пациентов с генотипом DR3/X (X ≠ DR4) соотношение М:Ж равно 1,7 ( $p = 9,3 \times 10^{-7}$ ), в то время как у пациентов с геноти-

пом DR4/Y ( $Y \neq DR3$ ) соотношение М:Ж равно 1,0. Эти данные не могут рассматриваться иначе, как дополнительное доказательство существования значительных различий в патогенезе СД типа 1 у пациентов с гаплотипами DR4 и DR3.

Действительно, анализ сцепления СД типа 1 с хромосомой X показал, как и ожидалось, что максимальный уровень сцепления области Xp11.4–p21.1 (маркер *DXS1068*) наблюдается в тех семьях, где оба sibса имеют генотипы *DR3/X* ( $n = 97$ ;  $MMLS = 3,5$  при  $p = 2,7 \times 10^{-4}$  и  $MLS = 4,5$  при  $p = 2,7 \times 10^{-5}$ ). Эти данные также свидетельствуют об этиологической гетерогенности локуса *IDDM1* и, поэтому, при изучении сцепления с СД типа 1 локусов, отличных от МНС, рекомендуется разделять изучаемые семьи по подгруппам в зависимости от генотипа локуса *IDDM1*.

**Ген глюкокиназы (*GCK*).** При анализе сцепления большой группы полиморфных маркеров, расположенных по всей длине хромосомы 7, с использованием коллекции ядерных семей (186) из США и Великобритании обнаружено сцепление пяти маркеров с СД типа 1, притом наибольшее сцепление показал маркер внутри гена *GCK* [Rowe et al., 1995]. Количество семей было увеличено до 339 и проведенный анализ подтвердил сцепление двух микросателлитных маркеров гена *GCK* с СД типа 1. Метод TDT также позволил выявить неравновесную передачу аллеля 4 маркера *GCK3* ( $p = 0,001$ ) в той же группе семей [Rowe et al., 1995]. С использованием метода SSCP проведен поиск аллельных вариантов во всех 12-ти экзонах гена *GCK*, и обнаруженные полиморфные маркеры использовали при анализе той же группы семей (по методу TDT), однако ни для одного из этих маркеров не удалось обнаружить неравновесной передачи аллелей [Rowe et al., 1995]. Ни в одном из полных геномных поисках не было обнаружено сцепления данного района 7p хромосомы 7 человека с СД типа 1 [Davies et al., 1994; Hashimoto et al., 1994; Mein et al., 1998; Concannon et al., 1998]. Таким образом, можно сделать вывод, что обнаруженное сцепление гена *GCK* с СД типа 1 было ошибочным.

**Ген индуцируемой NO-синтетазы (*NOS2*).** На экспериментальных моделях (мыши линии NOD и крысы) показано, что окись азота (NO) играет значительную роль в индуцируемом воздействием цитокинов разрушении  $\beta$ -клеток островков Лангерганса у грызунов. При этом индуцируемая форма NO-синтетазы (iNOS) является главным источником увеличенного синтеза NO в  $\beta$ -клетках. Именно поэтому ген *NOS2*, кодирующий индуцируемую форму NO-синтетазы, рассматривался в качестве гена-кандидата, несмотря на то, что ни в одном из полных геномных поисках не обнаружили сцепления данного района хромосомы 17 (17q11.2) человека с СД типа 1 [Davies et al., 1994; Hashimoto et al., 1994; Mein et al., 1998; Concannon et al., 1998]. Количество iNOS, синтезируемой в клетках, регулируется, главным образом, на уровне транскрипции, в связи с чем методом ETDT были изучены три полиморфных маркера в промоторной области гена *NOS2* и никакой ассоциации или сцепления с СД типа 1 обнаружено не было [Johannesen et al., 2000].

На следующем этапе исследования с помощью метода SSCP проведен поиск аллельных вариантов во всех 27-ми экзонах гена *NOS2* в датских семьях с СД типа 1. Последующее определение нуклеотидных последовательностей позволило идентифицировать 10 полиморфных участков, из которых четыре участка использовали для создания полиморфных маркеров и для анализа сцепления (по

методу TDT) при исследовании двух групп семей (ядерные и с дискордантными sibсами). Ни для одного из этих маркеров не удалось обнаружить статистически достоверной неравновесной передачи аллелей. Только после того, как sibсы были разбиты на две группы по локусу *HLA* с высоким и низким риском развития СД типа 1, был показан повышенный уровень передачи аллеля *T* маркера *E16* ( $p = 0,008$ ) sibсам с высоким риском развития СД типа 1. Это сцепление подтверждено и при анализе гаплотипов маркеров *E16-E20* ( $p = 0,045$ ).

Ни в одном из полных геномных поисков не обнаружено сцепления данного района (17q11.2) с СД типа 1 [Davies et al., 1994; Hashimoto et al., 1994; Mein et al., 1998; Concannon et al., 1998], поэтому нельзя исключить то, что вклад гена *NOS2* в развитие СД типа 1 относительно невелик. Поэтому, для выявления сцепления локусов с низким вкладом в развитие СД типа 1 необходимо или проведение анализа намного большего количества информативных семей, или же объединение имеющихся данных, полученных на различных коллекциях семей. Тем не менее проведенное исследование показывает, что для идентификации генов-кандидатов с небольшим вкладом в развитие СД типа 1 может оказаться полезен комплексный подход, основанный на комбинации геномного поиска и анализа полиморфных маркеров конкретных генов-кандидатов.

**Ген *CD4*.** Этот ген расположен на хромосоме 12 в области 12p12–pter и входит в состав кластера генов, кодирующих антигены дифференциации лейкоцитов человека. Предполагается, что функцией поверхностного антигена *CD4* является инициация или ускорение ранней фазы активации Т-клеток. Ассоциация полиморфного маркера внутри гена *CD4* с СД типа 1 впервые обнаружена у больных СД типа 1 из бельгийской популяции. При этом показано, что частота генотипа *A4/A4* значительно выше ( $p = 0,0077$ ) в группе пациентов с СД типа 1, чем в контрольной группе. Сцепление и ассоциация полиморфного маркера внутри гена *CD4* с СД типа 1 были подтверждены при анализе датских семей. При полном геномном поиске с использованием коллекции из 263 семей из Великобритании практически в той же области генома выявлено сцепление маркера *D12S99* (12p13–pter) с СД типа 1 [Mein et al., 1998]. Таким образом, ген *CD4* или расположенный рядом с ним другой ген из кластера генов, кодирующих антигены дифференциации, могут рассматриваться в качестве генов-кандидатов, предрасполагающих к развитию СД типа 1.

**Ген *IL18*.** На экспериментальной модели показано, что повышенный уровень синтеза мРНК *IL18* в макрофагах, вызванный увеличенной концентрацией интерферона  $\gamma$ , ассоциирован с развитием активной стадии аутоиммунного диабета у мышей линии NOD. В связи с этим выглядело вполне логичным изучение ассоциации гена *IL18* с СД типа 1 у человека. Ген *IL18* расположен на хромосоме 11q22.2–23.3. В промоторной области гена *IL18* обнаружены два однонуклеотидных полиморфных маркера: *G(-137)C* и *A(-607)C*, которые и были использованы для анализа ассоциации этого гена с СД типа 1 в группах больных и здоровых индивидов. Статистически значимая ассоциация с СД типа 1 показана для аллелей и генотипов маркера *G(-137)C*, а также для генотипов маркера *A(-607)C*. Полученные данные позволяют рассматривать ген *IL18* в качестве гена-кандидата, предрасполагающего к развитию СД типа 1.

**Новые локусы, обнаруженные при полных геномных поисках «второго поколения».** В результате полных геномных поисков «второго поколения» [Mein et al.,

1998; Concannon et al., 1998], проведенных в 1998 г. и основывавшихся на первых геномных поисках [Davies et al., 1994; Hashimoto et al., 1994], обнаружен ряд дополнительных локусов, для которых выявлено сцепление с СД типа 1, но которые пока не получили обозначения *IDDM* и соответствующего номера. В табл. 25 эти локусы обозначены названиями полиморфных маркеров, для которых показано сцепление. На хромосоме 1 (1q41-q43) обнаружено сцепление шести маркеров [Concannon et al., 1998], расположенных в геномном интервале длиной 7,6 сМ рядом с геном ангиотензиогена (*AGT*). Наибольшее значение *MLS* (2,8) имел маркер *DIS1617*. В одном из первых геномных поисков в этой области на протяжении 41 сМ наблюдался пробел, в котором не было ни одного маркера [Davies et al., 1994], в то время как в другом исследовании для подтверждения сцепления с СД типа 1 исследовано недостаточно семей [Hashimoto et al., 1994].

В работе по полному геномному поиску «второго поколения» [Mein et al., 1998] на хромосоме 1 также обнаружены два локуса, сцепленные с СД типа 1, но расположенные в областях 1p41-p34 и 1q12-q24 (табл. 25), величины *MLS* которых составляют только 0,1. Однако после разделения семей на подгруппы по генотипам *VNTR* гена *INS* для подгруппы семей с низким риском развития СД типа 1 получено значительно более высокое значение *MLS* (1,9) для локуса 1p41-p34. В случае локуса 1q12-q24 эффективным оказалось разделение по генотипам локуса *IDDM1*: для подгруппы семей с генотипом DR4/X ( $X \neq DR3$ ) была характерна значительно более высокая величина *MLS* — 1,7 [Mein et al., 1998].

На хромосоме 5 (табл. 25) также были обнаружены две области сцепления (5p15 и 5q34-qter) с СД типа 1 [Mein et al., 1998]. И в этом случае разделение семей на подгруппы по генотипам *VNTR* гена *INS* позволило получить значительно более высокие значения *MLS* для этих локусов среди семей с низким риском развития СД типа 1. В близкой к этому району области хромосомы 5 (5q31-q33) расположен ген *IL12B*, который рассматривается в качестве гена-кандидата развития СД типа 1.

Сцепление маркера *D12S99*, расположенного на хромосоме 12 (12p13-pter), с СД типа 1 обнаружено только в группе из 263 семей (*MLS* = 1,4), происходящих из Великобритании [Mein et al., 1998]. Как и в одном из предыдущих случаев эффективным оказалось разделение по генотипам локуса *IDDM1*: для подгруппы семей с генотипом DR3/4 получена более высокая величина *MLS* равная 1,8 (табл. 25). Практически в той же области генома расположен ген *CD4*, который рассматривался выше в качестве гена, предрасполагающего к развитию СД типа 1.

Еще одна область выраженного сцепления с СД типа 1 обнаружена на хромосоме 14 в районе 14q12-q21 [Mein et al., 1998]. И в этом случае наибольшая величина *MLS*, равная 2,7 (табл. 25), получена в подгруппе семей с генотипом DR4/X ( $X \neq DR3$ ). Но данная область сцепления не может быть отождествлена с локусом *IDDM11*, который предположительно расположен на той же хромосоме 14, но на расстоянии 33 сМ дистально от маркера *D14S276*.

В этой же работе на хромосоме 16 (16q22-q24) обнаружен локус, по величине вклада в генетическую предрасположенность к СД типа 1 не уступающий локусу *IDDM10*. Величина *MLS* для этого локуса достигает 3,7, а  $\lambda_s$  равняется 1,60 (табл. 25) [Mein et al., 1998]. Если данные по сцеплению и ассоциации этого локуса с СД типа 1 будут подтверждены, то этот локус может представлять особый интерес, тем более что для данной области хромосомы 16 показано сцепление с ас-



Таблица 25

## Новые локусы, обнаруженные при полных геномных поисках «второго» поколения

Локус	Ген-кандидат	Хромосомная локализация	$\lambda_s$	Величина MLS <sup>a</sup>	Ссылки
<i>D1S1644-AGT</i>	—	1q41-q43	—	2,8	2
<i>D1S255-D1S209</i>	—	1p31-19p34	—	0,1 (1,9)	17
<i>D1S305-D1S196</i>	—	1q12-q24	—	0,1 (1,7)	17
<i>D2S113</i>	<i>EIF2AK3</i>	2p12	—	2,1 (2,6)	9
<i>D5S405-D5S432</i>	—	5p15	—	1,2 (2,0)	17
<i>D5S422-D5S429</i>	<i>IL12B</i>	5q34-qter	—	0,9 (2,2)	17
<i>D5S407</i>	—	5p11-q13	—	1,93 (2,6)	9
<i>D12S99</i>	<i>CD4</i>	12p13-pter	—	1,4 (1,8)	17
<i>D14S70-D14S276</i>	—	14q12-q21	1,15	2,0 (2,7)	17
<i>D16S515-D16S520</i>	—	16q22-q24	1,60	3,4 (3,8)	17
<i>D16S405-D16S287</i>	—	16p	—	2,36 (3,6)	9
<i>D19S247-D19S226</i>	—	19p13	1,28	1,7 (1,8)	17
<i>D19S225</i>	—	19q13	1,16	1,6	17

<sup>a</sup> В скобках даны значения MLS, полученные в подгруппах семей. Разделение по генотипам MHC и VNTR гена *INS*.

тмой и псориазом [Mein et al., 1998]. И, наконец, два локуса, сцепленных с СД типа 1, выявлены на хромосоме 19: 19p13 и 19q13 [Mein et al., 1998]. Величины MLS для этих локусов равны 1,7 и 1,6, соответственно, а  $\lambda_s$  равняется 1,28 и 1,16 (табл. 25).

Несколько позже был проведен еще один геномный поиск с использованием относительно гомогенной коллекции из 424 семей (464 sibса с СД типа 1), происходящих из Дании, Швеции и Норвегии [European Consortium, 2001], который подтвердил, что и в этой популяции локус *IDDM1* является главным локусом, определяющим предрасположенность к СД типа 1. Кроме того, очень высокое значение MLS (4,8) получено для локуса *IDDM15*. Еще три локуса с MLS больше 2,0 обнаружены впервые на хромосомах 2 (*D2S113*), 5 (*D5S407*) и 16 (*D16S405-D16S287*). Рядом с маркером *D2S113* в области 2p12 находится ген *EIF2AK3*, в котором ранее выявлены мутации у пациентов с синдромом Уолкотта—Раллисона. При этом синдроме вскоре после рождения у детей развивается инсулинозависимый диабет, но без аутоиммунного процесса. Авторы полагают, что ген *EIF2AK3* может рассматриваться в качестве гена-кандидата и при СД типа 1. Следует отметить, что положение гена *EIF2AK3* на хромосоме 2 не совпадает с ранее обнаруженными в области 2q31-q33 локусами *IDDM7*, *IDDM12* и *IDDM13*, которые в данном исследовании [European Consortium, 2001] имели очень низкие значения MLS (0,04 – 0,79).

Локус в районе 5p11-q13 [European Consortium, 2001], также не совпадает с локусом *IDDM18* [Morahan et al., 2001] и другими локусами на хромосоме 5 [Mein et al., 1998]. В области сцепления с СД типа 1 на хромосоме 16 (см. табл. 25), длина которой составляет около 50 сМ и которая расположена между маркерами *D16S405* и *D16S287*, при разделении семей по генотипам локуса *HLA* и гена *INS* в разных подгруппах семей выявлены как минимум два пика сцепления, что позволяет предположить, что в этой области расположены не менее двух локусов, определяющих предрасположенность к СД типа 1.

И, наконец, в работе (полный геномный поиск), выполненной на 767 ядерных семьях из США и Великобритании, было получено очень высокое значение MLS (65,8) для локуса *IDDM1*, а для локусов *IDDM2* (MLS = 4,28) и *D16S3098* в области 16q22-q24 (MLS = 4,13) также обнаружен высокий уровень сцепления с СД типа 1 [Cox et al., 2001]. Еще для четырех локусов показаны достаточно высокие значения MLS (от 2,20 до 2,80) — эти локусы расположены в районах 10p11 (*IDDM10*), 2q31 (*IDDM7*, *IDDM12* и *IDDM13*), 6q21 (*IDDM15*) и 1q42. Разделение семей на подгруппы по возрасту начала СД типа 1 позволило также подтвердить сцепление с заболеванием области 6q27 (*IDDM8*).

### 8.3. В ЧЕМ ПРИЧИНЫ ТОГО, ЧТО НЕЛЬЗЯ СДЕЛАТЬ ОДНОЗНАЧНЫХ ВЫВОДОВ О НАЛИЧИИ СЦЕПЛЕНИЯ ГЕНОВ С СД ТИПА 1?

Из приведенных данных следует, что в отношении многих локусов нельзя сделать однозначных выводов о наличии сцепления с СД типа 1, так как результаты, полученные в разных исследованиях, принципиально противоречат друг другу. Это может объясняться несколькими причинами. Одной из них, как это было показано для локуса *IDDM2*, является геномный импринтинг, т.е. преимущественная инактивация локусов, предрасполагающих к СД типа 1 и унаследованных от родителей определенного пола. При этом в различных популяциях инактивированные локусы передаются по-разному: либо от отца, либо от матери.

Второй причиной является недостаточное число исследованных семей, что может приводить к обнаружению ложных локусов сцепления. Это хорошо видно при сравнении результатов, полученных в полных геномных поисках «первого и второго поколений», которые были выполнены, соответственно, на 96 и 356 семьях из Великобритании [Davies et al., 1994; Mein et al., 1998]. В поиске, проведенном на 96 семьях, было обнаружено 18 геномных интервалов с различным, в основном, слабым уровнем сцепления с СД типа 1 [Davies et al., 1994]. В полном геномном поиске «второго поколения», проведенном уже на 356 семьях, было, во-первых, подтверждено сцепление только некоторых из ранее обнаруженных локусов, а, во-вторых, обнаружено несколько новых областей сцепления с СД типа 1 [Mein et al., 1998]. Это хорошо иллюстрируется на примере локуса *IDDM10* (10p11.2). В работе, проведенной на 96 семьях, значение MLS для области 10p11.2—q11 было равно 1,3, в то время как при анализе сцепления на 356 семьях значение MLS достигло величины 4,7. Кроме того, в последней работе было окончательно подтверждено сцепление с СД типа 1 локусов *IDDM4*, *IDDM6* и *IDDM8* и обнаружена новая область выраженного сцепления с СД типа 1 на хромосоме 16 в районе 16q22-q24 [Mein et al., 1998].

Третья причина — генетическая гетерогенность СД типа 1, которая является следствием того, что в различных популяциях или группах людей присутствуют разные этиологические варианты генов, предрасполагающих к СД типа 1 (часто это связано с эффектом основателя). Кроме того, один и тот же этиологический вариант в разных популяциях может находиться в неравновесии по сцеплению с различными аллелями прилежащих полиморфных маркеров. Гетерогенность СД типа 1 проявляется как на

фенотипическом уровне (разный возраст манифестации заболевания и наличие/отсутствие аутоантител разного вида), так и на генетическом уровне, что хорошо видно на примере того же локуса *IDDM10*. Значения MLS для этого локуса в популяциях Великобритании и США различаются в несколько раз (см. табл. 23).

Другой удачный пример – ситуация с локусом *IDDM12*. Анализ по методу TDT, выполненный на пяти коллекциях семей из разных стран, показал преимущественную передачу аллеля *G* гена *CTLA4* больным сибсам из Италии, Испании и США. Однако в случае семей из Великобритании и Сардинии этого не наблюдалось. Наиболее логичное объяснение выявленных различий заключается в том, что не во всех популяциях существует неравновесие по сцеплению между аллелем *G* гена *CTLA4* и этиологическим вариантом, определяющим предрасположенность к СД типа 1 в этой области хромосомы 12 [Nistico et al., 1996].

Четвертая причина – случайное совпадение, которое часто сложно отличить от генетической гетерогенности. Во многих случаях слабое сцепление, обнаруженное на небольших коллекциях семей, может быть как раз следствием случайного совпадения. Видимо, в силу этой причины не удалось подтвердить сцепление с СД типа 1 локусов *IDDM3*, *IDDM11* и *GCK* [Luo et al., 1996; Mein et al., 1998; Concannon et al., 1998]. Кроме того, обнаруженное в первом геномном поиске слабое сцепление локусов, расположенных на хромосомах 8, 13, 16 и 17 [Davies et al., 1994], по всей видимости, также является следствием случайного совпадения.

И, наконец, пятая причина заключается в том, что если не удастся получить значимое сцепление с заболеванием, то часто используется подход, основанный на разделении общей коллекции семей на подгруппы по генотипам локуса *IDDM1* [Cox et al., 1998; Davies et al., 1994; European Consortium, 2001; Field et al., 1994; Hashimoto et al., 1994; Luo et al., 1995; Mein et al., 1998] и VNTR гена инсулина [Cox et al., 1998; European Consortium, 2001; Mein et al., 1998]. С одной стороны, этот метод имеет значительные преимущества. В частности, при полном геномном поиске «второго поколения» 10 из 16-ти новых локусов были обнаружены только благодаря использованию такого подхода [Mein et al., 1998]. Кроме того, выделение подгрупп при исследовании локусов *IDDM4* – *IDDM9* в той же работе [Mein et al., 1998] позволило в некоторых случаях получить значительно более высокие значения MLS (см. табл. 23). Однако, с другой стороны, достаточно произвольное разделение общей коллекции семей на подгруппы по генотипам какого-либо локуса может приводить к дополнительным несоответствиям при сравнении выводов с данными других авторов. В любом случае данный подход вряд ли является панацеей и результаты, полученные при таком анализе, сами по себе не могут рассматриваться как окончательное подтверждение сцепления.

## 8.4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ И СТРАТЕГИЯ БУДУЩИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Анализ встречаемости СД типа 1 у монозиготных близнецов показывает, что вероятность развития заболевания у второго близнеца, если первый уже заболел, равна 30–50%; у гетерозиготных близнецов эта величина составляет только

5–10%, что свидетельствует о важной роли генетических факторов в развитии данной патологии. Но в то же время у монозиготных близнецов ни в одной из популяций эта величина никогда не достигает 100%, что говорит о существенной роли в развитии заболевания окружающей среды. Таким образом, предрасположенность к СД типа 1 обусловлена как генетическими факторами, так и условиями окружающей среды.

С использованием подхода «ген-кандидат» в геноме человека удалось надежно идентифицировать только два локуса, связанных с предрасположенностью к развитию СД типа 1: **локус *IDDM1***, отождествляемый с локусом *MHC* и расположенный на хромосоме 6: бр21.3, и **локус *IDDM2***, представляющий собой полиморфный тандемный повтор (*VNTR*) в 5'-нетранскрибируемой области гена инсулина (*INS*), который находится на хромосоме 11 (11p15.5).

Новая эпоха в исследовании генетики СД типа 1 началась в 1994 г., когда были опубликованы первые работы по полному геномному поиску с использованием панели полиморфных маркеров и больших коллекций ядерных семей [Davies et al., 1994; Hashimoto et al., 1994]. Позже были проведены еще несколько полных геномных поиска «второго поколения» [Concannon et al., 2001; Cox et al., 2001; European Consortium, 2001; Mein et al., 1998], а также несколько частичных поисков. Некоторые из них были ориентированы на детальный анализ сцепления в тех областях генома, где ранее были обнаружены локусы, предрасполагающие к СД типа 1 (см. выше). Благодаря этим исследованиям было обнаружено более 30 областей генома, в различной степени сцепленных с СД типа 1 (см. табл. 23 и 25).

Все полные геномные поиски подтвердили, что главным и основным локусом из всех установленных и предрасполагающих к СД типа 1, является **локус *IDDM1***. Детальный анализ сцепления внутри этого локуса показал, что район максимального сцепления ( $MLS = 45$ ) находится на расстоянии 85 т.п.н. от гена *HLA-DQB1* в направлении теломеры хромосомы 6, однако вклад других генов класса II также значителен. Локус *IDDM1* определяет в среднем около 32% семейной ассоциации с СД типа 1. Все другие локусы предрасположенности к СД типа 1 по степени вклада в развитие заболевания значительно уступают *IDDM1*, однако следует подчеркнуть, что в отдельных популяциях вклад локуса *IDDM1* может быть существенно меньше, а вклад других локусов, соответственно, больше.

Локус *IDDM2* отождествляется в настоящее время с полиморфным маркером *VNTR* гена *INS*, который в разных популяциях определяет от 5 до 15% семейной ассоциации с СД типа 1. Полные геномные поиски как «первого», так и «второго поколений» [Concannon et al., 1998; Cox et al., 2001; Davies et al., 1994; Mein et al., 1998], подтвердили сцепление этого маркера с СД типа 1. Однако при анализе наследования аллелей этого локуса была обнаружена значительная популяционная гетерогенность, связанная скорее всего с тем, что в некоторых популяциях наблюдается материнский тип импринтинга, в то время как в других – отцовский. Кроме того, важно отметить, что аллели класса III *VNTR* гена *INS* относятся к «доминантно-предохраняющим», в то время как аллели класса I являются только «рецессивно-предрасполагающими» к СД типа 1.

К настоящему времени можно считать окончательно доказанным сцепление еще нескольких локусов с СД типа 1. К ним относятся **локусы *IDDM4*, *IDDM5*, *IDDM6*, *IDDM8*, *IDDM10*, *IDDM12*, *IDDM13*** и маркер *DXS1068*, расположенный на хромосоме X. По всей видимости, локус *IDDM12* можно отождествить с геном

*CTLA4*, хотя для окончательного решения этого вопроса требуются дополнительные эксперименты. Очень высока вероятность, что в ближайшее время будет окончательно доказано сцепление с СД типа 1 локусов *IDDM7*, *IDDM9* и *IDDM15*, хотя для локуса *IDDM15* это несколько затруднено в силу того, что он находится рядом с локусом *IDDM1*. Видимо, обнаруженное в ряде работ сцепление с СД типа 1 локусов *IDDM3*, *IDDM11* и *GSK* связано со случайным совпадением, и маловероятно, что оно будет подтверждено в будущем.

Еще несколько генов можно считать генами-кандидатами. В некоторых случаях их ассоциация с СД типа 1 проверялась в связи с тем, что продукты этих генов вовлечены в развитие экспериментального диабета у мышей, как это было показано для генов *IL12B*, *IL18* и *NOS2*. В случае гена *CD4* его ассоциацию с СД типа 1 проверяли в связи с тем, что функцией продукта этого гена является инициация или ускорение ранней фазы активации Т-клеток. Для полиморфных маркеров всех четырех генов обнаружены ассоциация и/или сцепление с СД типа 1, хотя в случае гена *NOS2* имеет место очень слабое сцепление, обнаруживаемое только методом ETDT. Но ни для одного из этих генов сцепление с СД типа 1 нельзя считать окончательно доказанным.

Какие направления дальнейших исследований в области идентификации генетических факторов, предрасполагающих к СД типа 1, уже просматриваются в настоящее время? Во-первых, существует тенденция к увеличению общего числа семей, результаты обследования которых используются при анализе сцепления, что увеличивает достоверность результатов. Кроме того, имеет значение объединение экспериментальных данных по сцеплению, полученных в разных лабораториях и для ядерных семей из разных популяций, для проведения комплексного анализа и повышения достоверности сцепления определенных геномных интервалов с СД типа 1. При этом важно подчеркнуть, что механическое объединение данных, полученных при обследовании семей с дискордантными сибсами, в сочетании с методом ETDT не всегда приводит к увеличению достоверности результатов, так как в отдельных популяциях «прародительские» хромосомы могут нести различные аллели микросателлитного маркера (эффект основателя) и мешать выявлению индивидуальных аллельных ассоциаций.

Во-вторых, значительное внимание будет уделено подтверждению сцепления с СД типа 1 ряда локусов, в отношении которых остаются некоторые сомнения. Для этой цели будет использован анализ ядерных семей, а также семей с дискордантными сибсами и семей с одним больным ребенком в сочетании с методом ETDT. Для решения этой важной задачи большое значение будет иметь создание новых коллекций семей из ранее не изученных популяций и групп полиморфных маркеров, плотно располагающихся в районах возможной локализации локусов, предрасполагающих к СД типа 1.

В-третьих, необходимо детальное картирование подтвержденных геномных интервалов и создание физических карт с использованием клонированных фрагментов ДНК, полученных из векторов различного происхождения (YAC, BAC, PAC). Исследования такого рода уже проведены для локусов *IDDM8* и *IDDM12* и, например, размер фрагмента ДНК, в котором расположен локус *IDDM8*, удалось уменьшить до 200 т.п.н.

В-четвертых, почти полное завершение программы «Геном человека» и реальная доступность нуклеотидных последовательностей генома человека открывает

возможности для идентификации генов-кандидатов, расположенных внутри геномных интервалов, сцепленных с СД типа 1. Анализ сцепления с СД типа 1 полиморфных маркеров, расположенных внутри этих генов-кандидатов, позволит выявить конкретные гены и этиологические варианты, которые предрасполагают к развитию СД типа 1.

В-пятых, для понимания генетических механизмов, приводящих к развитию СД типа 1, необходимо выяснение функций выявленных генов предрасположенности и их роли в развитии патогенетического процесса. Одним из возможных подходов является создание трансгенных мышей, несущих соответствующие гены человека и потерявших собственные гены с аналогичной функцией.

И, наконец, в-шестых, существование генетической гетерогенности СД типа 1 обуславливает необходимость проведения дополнительных исследований реально встречающихся модификаций патогенетических процессов, существующих как внутри одной популяции, так и в разных популяциях. В настоящий момент все большую популярность получает гипотеза, основанная на том, что первопричиной СД типа 1 являются некие нарушения в механизмах установления иммунологической толерантности, приводящие к тому, что для некоторых собственных белков организма не устанавливается полная толерантность и, как следствие этого, часть аутореактивных Т-клеток не уничтожается полностью. Одним из таких белков, несомненно, является проинсулин. Однако в некоторых популяциях наблюдается достаточно слабое сцепление этого гена с СД типа 1, что позволяет предположить, что существуют и другие белки, для которых также не устанавливается полная толерантность.

Другой тип гетерогенности связан с развитием аутоиммунного процесса. Давно известно, что начавшийся аутоиммунный процесс не всегда приводит к манифестации СД типа 1. Недавно было показано, что это может быть связано с различной устойчивостью  $\beta$ -клеток, которая определяется уровнем экспрессии ряда белков, защищающих эти клетки от токсического действия окиси азота и цитокинов [Larsen et al, 2001].

## Литература

Носиков В.В., Серегин Ю.А., Титович Е.В. и др. Генетический анализ семей с сибсами, больными сахарным диабетом типа 1 // Сахарный диабет. 2002. N. 1. P. 34–37.

Concannon P., Gogolin-Ewens K.J., Hinds D.A. et al. A second-generation screen of the human genome for susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus // Nat. Genet. 1998. Vol. 19. N. 3. P. 292–296.

Concannon P. Seven regions of the genome show evidence of linkage to type 1 diabetes in a consensus analysis of 767 multiplex families // Am. J. Hum. Genet. 2001. Vol. 69. N. 4. P. 820–830.

Copeman J.B., Cucca F., Hearne C.M. et al. Linkage disequilibrium mapping of a type 1 diabetes susceptibility gene (*IDDM7*) to chromosome 2q31–q33 // Nat. Genet. 1995. Vol. 9. N. 1. P. 80–85.

Cordell H.J., Kawaguchi Y., Todd J.A., Farrall M. An extension of the maximum lod score method to X-linked loci // Ann. Hum. Genet. 1995. Vol. 59. (Pt 4). P. 435–449.

Cox N.J., Wapelhorst B., Morrison V.A. et al. Saturation multipoint linkage mapping of chromosome 6q in type 1 diabetes // *Hum. Mol. Genet.* 1996. Vol. 5. N. 7. P. 1071–1074.

Davies J.L., Kawaguchi Y., Bennett S.T. et al. A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes // *Nature.* 1994. Vol. 37. P. 130–136.

Delepine M., Pociot F., Habita C. et al. Evidence of a non-MHC susceptibility locus in type I diabetes linked to HLA on chromosome 6 // *Am. J. Hum. Genet.* 1997. Vol. 60. N. 1. P. 174–187.

European Consortium for IDDM Studies. A genomewide scan for type 1-diabetes susceptibility in Scandinavian families: identification of new loci with evidence of interactions // *Ibid.* 2001. Vol. 69. N. 6. P. 1301–1313.

Field L.L., Tobias R., Magnus T. A locus on chromosome 15q26 (*IDDM3*) produces susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus // *Nat. Genet.* 1994. Vol. 8. P. 189–194.

Field L.L., Tobias R., Thomson G., Plon S. Susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus maps to a locus (*IDDM11*) on human chromosome 14q24.3–q31 // *Genomics.* 1996. Vol. 33. N. 1. P. 1–8.

Hashimoto L., Habita C., Beressl J.P. et al. Genetic mapping of a susceptibility locus for insulin-dependent diabetes mellitus on chromosome 11q // *Nature.* 1994. Vol. 371. P. 161–164.

Johannesen J., Pociot F., Kristiansen O.P. et al. No evidence for linkage in the promoter region of the inducible nitric oxide synthase gene (*NOS2*) in a Danish type 1 diabetes population // *Genes Immun.* 2000. Vol. 1. N. 6. P. 362–366.

Larsen P.M., Fey S.J., Larsen M.R. et al. Proteome analysis of interleukin-1 beta-induced changes in protein expression in rat islets of Langerhans // *Diabetes.* 2001. Vol. 50. N. 5. P. 1056–1063.

Luo D.-F., Bui M.M., Maclaren N.K. et al. Affected-sib-pair mapped of a novel susceptibility gene to insulin-dependent diabetes mellitus (*IDDM8*) on chromosome 6q25–q27 // *Am. J. Hum. Genet.* 1995. Vol. 57. P. 911–919.

Luo D.-F., Buzzetti R., Rotter J.I. et al. Confirmation of three susceptibility genes to insulin-dependent diabetes mellitus: *IDDM4*, *IDDM5* and *IDDM8* // *Hum. Mol. Genet.* 1996. Vol. 5. N. 5. P. 693–698.

Mein C.A., Esposito L., Dunn M.G. et al. A search for type 1 diabetes susceptibility genes in families from the United Kingdom // *Nat. Genet.* 1998. Vol. 19. N. 3. P. 297–300.

Morahan G., Huang D., Tait B.D. et al. Markers on distal chromosome 2q linked to insulin-dependent diabetes mellitus // *Science.* 1996. Vol. 272. N. 5269. P. 1811–1813.

Morahan G., Huang D., Ymer S.I. et al. Linkage disequilibrium of a type 1 diabetes susceptibility locus with a regulatory *IL12B* allele // *Nat. Genet.* 2001. Vol. 27. N. 2. P. 218–221.

Nistico L., Buzzetti R., Pritchard L.E. et al. The *CTLA-4* gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes // *Hum. Mol. Genet.* 1996. Vol. 5. N. 7. P. 1075–1080.

Nolsoe R.L., Kristiansen O.P., Larsen Z.M. et al. Complete mutation scan of the human Fas ligand gene: linkage studies in Type I diabetes mellitus families // *Diabetologia.* 2002. Vol. 45. N. 1. P. 134–139.

Owerbach D. Physical and genetic mapping of *IDDM8* on chromosome 6q27 // *Diabetes.* 2000. Vol. 49. N. 3. P. 508–512.

*Reed P., Cucca F., Jenkins S.* et al. Evidence for a type 1 diabetes susceptibility focus (*IDDM10*) on human chromosome 10p11-q11 // *Hum. Mol. Genet.* 1997. Vol. 6. N. 7. P. 1011–1016.

*Rowe R.E., Wapelhorst B., Bell G.I.* et al. Linkage and association between insulin-dependent diabetes mellitus (*IDDM*) susceptibility and markers near the glucokinase gene on chromosome 7 // *Nat. Genet.* 1995. Vol. 10. P. 240–242.

*Verge C.F., Vardi P., Babu S.* et al. Evidence for oligogenic inheritance of type 1 diabetes in a large Bedouin Arab family // *J. Clin. Invest.* 1998. Vol. 102. N. 8. P. 1569–1575.



# Этногеномика

Э.К. Хуснутдинова, С.А. Лимборская

## 9.1. ПОЛИМОРФИЗМ ДНК И ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ИСТОРИИ И ПРОИСХОЖДЕНИЯ НАРОДОВ

Вопросы эволюции популяций человека, их происхождения, родства и исторического развития всегда были в центре внимания популяционных генетиков. Для решения подобных проблем необходимо исследовать возможно большее число полиморфных признаков в большом числе популяций и этно-территориальных групп. В качестве таких признаков в распоряжении исследователей в течение долгого времени находились полиморфные белки, которые использовались в качестве генетических маркеров в популяционных исследованиях.

Сейчас эти маркеры стали называть классическими, чтобы отличить их от появившихся в последнее время маркеров ДНК. С помощью классических маркеров (преимущественно немногих наиболее изученных) получено довольно много интересных сведений о популяциях различных регионов мира. Но подлинный переворот в популяционных исследованиях произошел при появлении нового инструмента в виде *полиморфных маркеров ДНК*.

Огромное количество ДНК-маркеров, выявленное при расшифровке генома человека, стало мощным инструментом для анализа генофонда, его основных характеристик, динамики, истории и географии. На основе развития этих исследований в рамках геномики возник новый раздел — *этническая геномика* или *этногеномика*. Основной задачей этногеномики является изучение особенностей геномного полиморфизма и геномного разнообразия на разных уровнях популяционной системы народонаселения — отдельных популяций, этносов, этно-территориальных общностей. Преимущества изучения генетического полиморфизма на уровне ДНК по сравнению с белковым уровнем — колоссальны. Информационное содержание ДНК значительно выше белкового, особенно если речь идет лишь о той группе белков, которая доступна для массового анализа. Кроме того, техника исследования маркеров ДНК сводится к ограниченному числу методов, а для большинства — практически к одному методу — полимеразной цепной реакции (ПЦР), что предполагает возможность автоматизации анализа, включая использование чипов. Наиболее важным преимуществом ДНК является наличие в ней полиморфизмов разного типа, каждый из которых имеет свои особенности. Это — однонуклеотидные замены, инсерционно-делеционный полиморфизм, мини- и микросателлиты. Нерешенной проблемой является оценка влияния отбора на ДНК-маркеры. По-видимому, можно утверждать уже сейчас, что спектр селективных свойств ДНК-маркеров намного шире, чем классических маркеров белкового полиморфизма: он варьирует от истинно селективно-нейтральных ге-

нов до генов, подверженных самому мощному отбору — как стабилизирующему, так и дифференцирующему. ДНК-маркеры более эффективно, чем классические, позволяют также исследовать гаплотипы — сочетания аллелей тесно сцепленных полиморфных локусов. Такие хромосомные участки весьма невелики, поэтому обнаруживают очень малую степень рекомбинации и ведут себя как единые блоки, мало меняющиеся во времени и поэтому имеющие довольно древнее происхождение. Таким образом, с помощью размера сохранившегося неизменным гаплотипа можно оценить время, которое прошло от какого-то момента в прошлом. В общем случае, суть метода состоит в поиске неравновесного сцепления локусов между собой вследствие эффекта основателя. Анализ частоты и возраста появления в популяции хромосомы-основателя позволяет проследить историю локуса, а вместе с ней и популяционные события, сопутствующие ее распространению. Очевидно, что подобные данные представляют несомненный интерес и огромную научную значимость для изучения истории современных народов, характеристики генофондов и оценки основных направлений эволюции всего человечества.

Важно отметить, что все маркеры ДНК с позиций популяционных исследований можно разделить на три группы: *маркеры митохондриальной ДНК* (мтДНК), *аутосомные маркеры*, и *маркеры Y-хромосомы*. Полиморфизм этих маркеров определяется факторами микроэволюции (миграция, селекция, генетический дрейф, мутации). Однако характер их варибельности по-разному отражает действие и результат этих процессов.

Полиморфизм мтДНК используется в популяционных исследованиях сравнительно давно из-за относительной простоты выделения ДНК. Основной особенностью этого полиморфизма является отсутствие рекомбинаций, высокий уровень изменчивости и материнский тип наследования.

Y-хромосомный полиморфизм является как бы комплементарным митохондриальному — имеет отцовское наследование, но также обнаруживает отсутствие рекомбинации (за исключением псевдоаутосомного региона).

Оба типа полиморфизма дополняют друг друга, позволяя получить отдельную информацию об отцовском и материнском вкладе в эволюцию популяций. Это явление предоставляет новые, не существовавшие ранее возможности в популяционных исследованиях — проследить и сопоставить историю женской и мужской части популяции и оценить их вклад в популяционный генофонд.

Передаваясь из поколения в поколение только по одной из родительских линий и не участвуя в рекомбинации, такие полиморфизмы позволяют, по крайней мере теоретически, реконструировать генетические события от гипотетических предков современного человека — «Y-хромосомного» Адама и «митохондриальной» Евы до современных популяций.

Ядерные аутосомные маркеры ДНК характеризуют сообщества в целом, не акцентируя внимание на особенности генетического вклада различных полов. Использование определенных типов ядерного полиморфизма, как полагают многие исследователи, позволяет оценить те или иные временные события, происходившие в истории популяции.

В настоящее время изучение полиморфизма ДНК проводится во многих популяциях мира. Подобные исследования позволяют выявлять значительные внутри- и межпопуляционные различия в частотах полиморфных фрагментов ДНК во

многих географических регионах мира, что стало одной из важнейших характеристик генетической структуры популяций человека.

Временные параметры, касающиеся происхождения и становления *Homo sapiens* как вида, с помощью маркеров ДНК впервые были оценены при использовании митохондриального полиморфизма. В связи с тем, что в митохондриальной ДНК не наблюдается рекомбинации и она наследуется как единый блок или гаплотип, исследователи смогли реконструкцию генеалогии митохондриальных нуклеотидных последовательностей и построить простую модель распределения парных нуклеотидных различий.

Обнаружено, что все человеческие мтДНК могут иметь единого предка и с некоторыми допущениями можно рассчитать, когда произошло первое разветвление генеалогического древа мтДНК. Для этого нужно знать скорость мутаций в мтДНК. Один из методов «калибровки» митохондриальных «часов» — сравнение нуклеотидных последовательностей в образцах мтДНК человека и шимпанзе, с учетом того, что указанные виды дивергировали 5–7 млн лет назад. Оценка средней скорости мутаций в ДНК митохондрий была проведена в 1991 г. и составила  $1\text{--}5 \times 10^{-6}$  мутаций на нуклеотид за поколение, что, по крайней мере, на два порядка выше, чем скорость мутаций ядерной ДНК.

Секвенирование большого числа индивидуальных мтДНК (D-петли) показало, что африканские популяции имеют наибольшую внутреннюю гетерогенность по сравнению с популяциями других континентов. Одним из возможных объяснений этого факта является большая древность африканских мтДНК. Расчеты, проведенные на основе этих результатов, показали, что дивергенция мтДНК началась около 150 000 лет назад [Horai et al., 1995].

В этой связи интересное исследование было проведено на образцах мтДНК, выделенной из костей неандертальцев. Один из образцов — известная находка из Дюссельдорфа, обнаруженная в 1856 г. Было секвенировано 380 нуклеотидов из региона 1 D-петли [Krings et al., 1997]. Если средние попарные различия у современного человека в этой области составляют величину 8,0 (с колебаниями от 1 до 24), то размах различий между неандертальцем и современным человеком составил от 22 до 36. Общий предок для этих видов, как показали расчеты, мог существовать в пределах от 550 до 680 тысячелетий тому назад.

Совсем недавно было проведено исследование ДНК других неандертальских образцов в сравнении с древним образцом *Homo sapiens*. При этом анализировали не мтДНК, а ядерную (очевидно — повторяющиеся последовательности). Костные фрагменты неандертальцев представляли собой хорошо охарактеризованные объекты из Варендорфа (Германия) и из Крапины (Хорватия). Древний образец *Homo sapiens* был взят от объекта Штеттен I, из пещеры возле Вогельгера (Германия). Кроме того, в работе для сравнения использовали фрагменты костей мамонта, а также современного человека и шимпанзе. Выделенная из объектов ДНК была подвергнута блот-гибридизации с различными радиоактивно мечеными образцами ДНК тех же объектов. Оказалось, что оба неандертальских образца ДНК давали сходный сигнал гибридации друг с другом и в два раза меньший сигнал — с ДНК древнего *Homo sapiens*. Наоборот, ДНК последнего объекта гибридовалась сама с собой в два раза интенсивнее, чем с неандертальским образцом ДНК. Если в качестве меченой пробы брали ДНК современного человека, то гибридизация с ДНК древнего *Homo sapiens* была в несколько раз выше, чем

с ДНК неандертальцев. ДНК шимпанзе гибридизовалась в слабой степени одинаково со всеми тремя древними образцами и ДНК современного *Homo sapiens*, и такие результаты явились дополнительным подтверждением того, что это, возможно, разные виды.

То, что многообразие ДНК африканских популяций выше, чем всех остальных, было показано не только с помощью митохондриальных маркеров, но и позже, и с помощью ядерных [Tishkoff et al., 1996].

Данные по маркерам Y-хромосомы также показывают, что наиболее древние варианты обнаруживаются в Африке. Эти результаты в совокупности позволяют предполагать африканское происхождение *Homo sapiens*. Однако в этом вопросе следует соблюдать большую осторожность, так как приведенная интерпретация является только предположением, вытекающим из расчетов, кроме того, вычисленные даты могут относиться не к *Homo sapiens*, а к виду, предшествовавшему современному человеку (либо к его конкретным популяциям). Следует также принимать во внимание многочисленные палеоантропологические данные, свидетельствующие о других, или даже множественных регионах возникновения *Homo sapiens*.

Большую роль маркеры ДНК играют в изучении этнической истории отдельных регионов мира. Один из весьма изученных регионов — это Европа (имеется в виду Западная Европа, не включающая Европейскую часть России и близлежащие Восточно-Европейские страны — Белоруссию, Украину, Молдавию и др.). Был проведен анализ мтДНК из популяций Европы и Ближнего Востока [Vertranpetit et al., 1995]. Всего было исследовано около 500 человек, среди них — баски, британцы, швейцарцы, тосканцы, сардинцы, болгары, турки и жители Ближнего Востока, включавшие саудовских бедуинов, палестинцев и йеменских евреев — т.е. народы, относящиеся к европеоидам. Первый гипервариабельный участок мтДНК каждого индивидуума был секвенирован, и на этих данных проведен анализ вариабельности. В работе, как и во многих предыдущих, был продемонстрирован низкий уровень генетического разнообразия европеоидов по сравнению с другими, в особенности — африканцами. Это может быть связано с двумя причинами — либо с относительно недавним их происхождением, либо с высокой скоростью миграции. Однако, несмотря на сравнительную гомогенность европейских популяций, имеются определенные географические различия в генетической вариабельности. Для анализа этого явления были использованы оценки распределения попарных различий между популяциями, что позволяет выявить прошлые популяционные экспансии. Известно, что такого рода экспансии сказываются на распределении попарных различий, приводя к сглаженной колоколообразной форме кривой, тогда как стационарные ситуации обуславливают мультимодальное распределение. Во всех исследованных популяциях обнаружили, что кривая распределения попарных различий имеет сглаженную колоколообразную форму. Кроме того, модальные величины показывали клинимальную изменчивость в направлении от Ближнего Востока к баскам. Этот результат подтверждал предположение об экспансии населения из Ближнего Востока в Европу по всей территории, исследованной в данной работе. Расчеты показали, что экспансия осуществлялась довольно длительное время — на протяжении десятков тысячелетий. Другие статистические методы, в том числе анализ митохондриальных гаплотипов и гаплогрупп в исследованных популяциях, под-

тверждали выводы об экспансии с Ближнего Востока. Данные позволяют предположить, что основные генетические характеристики европейцев, по-видимому, сложились еще в палеолите, тогда как более поздние неолитические экспансии оказывали меньшее влияние на изучаемый генофонд.

К аналогичному выводу пришли и другие авторы [Sykes et al., 1995], проводя исследования митохондриальных гаплотипов более чем 700 человек из 14 популяций Европы и Ближнего Востока. Использование метода медианных сетей и подробный анализ ветвей каждой гаплогруппы позволили авторам сделать следующий вывод: большинство населения современной Европы (имеется в виду — Западная Европа, как следует из перечня изученных популяций), является потомками ранних поселенцев, пришедших из районов Ближнего Востока в период верхнего палеолита. Обнаружены также данные и о более поздних продвижениях в Европу выходцев из Ближнего Востока, однако эта экспансия оказала значительно меньшее влияние, чем предыдущая.

Молекулярно-генетические маркеры активно используются при изучении африканских популяций. Проведено исследование, в котором несколько популяций из Западной Африки сравнивается с популяциями других континентов (всего 46 популяций) [Excoffier et al., 1996]. Анализ митохондриальных гаплотипов с помощью метода многомерного шкалирования показал существенное разнообразие и отличие африканских популяций от всех остальных. Азиатские, европейские, американские (коренные), североафриканские популяции по этому анализу были существенно ближе друг к другу и менее разнообразны. Исследование полиморфизма Y-хромосомы в тех же популяциях и с помощью того же метода статистического анализа (многомерное шкалирование) привели к тем же выводам — об отличиях популяций Западной и Южной Африки от всех остальных. И, наконец, анализ ядерных аутомомных маркеров дал аналогичный результат. Интересно, что в последнем случае имелось очень хорошее соответствие между географическими и генетическими расстояниями в изученных популяциях. Авторы отмечают, что полиморфизм ядерных маркеров ДНК дает более сбалансированную картину генетического разнообразия, лучше дифференцирует европейские и азиатские популяции, включая кластеры внутри них, что не удается с помощью митохондриальных и Y-хромосомных маркеров. Ядерные маркеры подчеркивают важность географических факторов, в частности, роль географических барьеров уровней генных потоков.

Данное исследование интересно тем, что показано отличие в вариабельности генетического разнообразия, полученного с помощью митохондриального и Y-хромосомного полиморфизма. Казалось, что митохондриальный геном должен быть более вариабельным, чем Y-хромосома, из-за более высокой скорости мутаций. Однако в евразийских популяциях был обнаружен больший полиморфизм по Y-хромосомным маркерам, чем по митохондриальным. Кроме того, эти популяции по Y-хромосомному полиморфизму были более гетерогенны, чем африканские. Из этих данных стало ясно, что различия между наблюдаемой митохондриальной и Y-хромосомной эволюцией невозможно объяснить разницей в скорости мутаций. По-видимому, здесь могут вмешиваться факторы другого порядка, например, социально-демографические или селективные.

В последнее время активно обсуждалась идея, высказанная в 1998 г. [Stonning, 1998], о том, что более высокая кластерированность популяций

(особенно европейских) по Y-хромосомным маркерам в сравнении с митохондриальными, связана с различиями в дистанциях миграций между женщинами и мужчинами. Согласно этой идее, миграция мужчин оказывается более ограниченной пространственно, чем миграция женщин. Однако к таким выводам следует относиться с большой осторожностью, так как еще многие популяционные свойства маркеров ДНК, особенно в сравнении одного с другим, мало изучены. Кроме того, весомый вклад могут вносить в это явление такие демографические факторы, как полигамия, имеющаяся или имевшаяся ранее у многих народов.

Тем не менее необходимо подчеркнуть, что наличие такой возможности как анализ отдельно и мужской, и женской популяционной истории, открывает новые перспективы в изучении популяций, которых не было ранее, до обнаружения сцепленных с полом маркеров ДНК, связанных с митохондриальным и Y-хромосомным полиморфизмом.

Изучение популяций американских индейцев и их связи с сибирскими народами также осуществлялось с помощью маркеров ДНК. Продемонстрировано соответствие лингвистических данных по этим народам с результатами анализа митохондриального полиморфизма [Ward, Valencia, 1996]. Исследовались представители десяти лингвистических семей, среди них алтайцы, уральская, чукотско-камчатская, эскимосско-алеутская группы и ряд языковых семей американских индейцев. Оказалось, что на основе анализа мтДНК наиболее отдаленными оказались представители алтайской языковой группы, затем уральской. В этих двух позициях (ответвления языковых семей от основного ствола) митохондриальные маркеры дали те же результаты, что и классические маркеры. Однако далее кластеризация языковых семей осуществлялась разными способами. Показано, что дивергенция мтДНК в популяциях лингвистических ветвей Берингии была значительно ниже, чем в лингвистических ветвях американских индейцев. Сделано предположение, что языковая эволюция популяций Нового Света проходила с очень разной скоростью на фоне более или менее равномерной генетической эволюции.

Отделение американских индейцев от остальных групп, по-видимому, произошло не менее 14,5 тыс. лет назад, если принять, что скорость мутации митохондриального генома равна 1% за 8900 лет. Эскимосско-алеутская группа является более молодой и имеет возраст 9000 лет, чукотско-алеутская — более древняя — 12 000 лет, уральская группа — 8000 лет. При этом известно, что заселение Берингии осуществлялось около 30 000 лет назад.

Последние исследования гаплотипов Y-хромосомы в этом регионе показали, что миграции в Новый Свет через Берингию происходили неоднократно, причем в основном из Центральной Сибири, предположительно из района оз. Байкал [Karafet et al., 1999, Jorde et al., 2000, Kayser et al., 2001].

С помощью полиморфных маркеров ДНК были проведены интересные исследования относительно заселения тихоокеанских архипелагов. На популяциях этих островов еще в исследованиях по классическим маркерам было показано хорошее соответствие географических и генетических расстояний. В то же время лингвистические данные не давали корреляции ни с теми, ни с другими параметрами. Следующим этапом исследования этих популяций явился анализ ДНК-полиморфизма, в частности — мтДНК и глобиновых генов, играющих важную роль в данном регионе.

Подводя итоги по изучению тихоокеанских популяций с помощью митохондриального генома и  $\alpha$ -глобинового полиморфизма, исследователи подтвердили уже принятую точку зрения об экспансии из районов Юго-Восточной Азии на тихоокеанские острова. Однако подробный анализ показал, что это был непростой и длительный процесс.

В первую очередь были изучены делеционные мутации  $\alpha$ -глобиновых генов, которые, как полагают, определяют устойчивость к малярии, что очень важно для данного региона. Оказалось, что в Юго-Восточной Азии, на островах Меланезии, Полинезии и Микронезии спектры делеционных мутаций  $\alpha$ -глобиновых генов частично перекрываются, но различаются по мажорным, самым часто встречающимся вариантам. Сочетания полиморфных маркеров вблизи  $\alpha$ -глобиновых генов (гаплотипы) также сильно варьировали в разных популяциях, лишь частично перекрываясь. Население Юго-Восточной Азии сильно отличалось по гаплотипам от Меланезии, тогда как население Полинезии имело сочетания гаплотипов, характерных как для Юго-Восточной Азии, так и для Меланезии.

Изучение мтДНК показало, что на островах Океании с частотой до 80–90% встречается специфическая делеция в 9 пар нуклеотидов, в Юго-Восточной Азии частота ее встречаемости значительно меньше. Секвенирование показало, что данная делеция встречается в разном генетическом контексте (в сочетании с различными полиморфными участками). При этом можно выделить так называемые мотивы, в которых она встречается: меланезийский, полинезийский и мотив Юго-Восточной Азии. Меланезийский мотив сильно отличается от мотива Юго-Восточной Азии, тогда как полинезийский представляет собой один из компонентов юго-восточно-азиатского. Он довольно часто встречается в «коридоре» от Тайваня к югу и востоку через Филиппины и восточную Индонезию. Все представленные данные позволили предположить, что между островами Меланезии и Юго-Восточной Азии в древности (до заселения восточной части Океании) осуществлялись лишь ограниченные контакты, без интенсивного смешения населения. Восточная Полинезия несомненно заселялась из обоих регионов очень малыми группами, что приводило к определенным генетическим последствиям, обусловившим специфичность генофонда этих островов. Наиболее вероятный путь экспансии начинался восточнее Папуа — Новой Гвинеи, шел через Вануату в Фиджи и Полинезию и осуществлялся популяциями, которые не относились целиком к юго-восточно-азиатским.

В этой связи весьма интересной работой является исследование населения Мадагаскара. История и время заселения этого острова остаются неизвестными из-за отсутствия письменных свидетельств. Немногочисленные археологические данные указывают на то, что первые поселенцы явились выходцами предположительно из Индонезии (находки датируются началом первого тысячелетия нашей эры), позднее произошло заселение из Африки. От Африки Мадагаскар отделен проливом шириной 400 км, расстояние до Индонезии — 6400 км. Население острова сейчас составляет 11 млн человек, подразделено на 18 этнических групп. Язык относится к австронезийской группе с региональными различиями в диалектах, имеющих особенности, указывающие на арабское и африканское влияние.

Изучение мтДНК у населения Мадагаскара обнаружило высокую частоту встречаемости специфической делеции размером 9 пар нуклеотидов, находя-

шейся в окружении полиморфных участков, образующих полинезийский мотив (см. выше). Этот результат можно объяснить тем, что первые поселенцы Мадагаскара прибыли или непосредственно из Полинезии, или относились к той популяции, выходцы которой заселяли также и Полинезию, но их путь на Мадагаскар проходил через Индонезию.

Из приведенных примеров очевидно, что маркеры ДНК дают возможность по-новому взглянуть на многие как недавние, так и отдаленные события эволюции человека. Более подробное знание особенностей тех или иных групп маркеров позволит в дальнейшем использовать их для конкретных целей, получения ответов на вопросы, связанные с различными временными и пространственными параметрами. Необходимо отметить, что чрезвычайно важным фактором в использовании маркеров ДНК являются методы статистического анализа, с помощью которых можно попытаться извлечь объективную информацию из большого массива данных, полученных в таких исследованиях. В настоящее время разрабатываются или адаптируются к генетическим исследованиям многие методы, и в первую очередь — *многомерного статистического анализа* [Zhivotovsky, 2000, 2001]. Весьма перспективными и информативными являются *методы компьютерной геногеографии*.

## 9.2. АУТОСОМНЫЕ МАРКЕРЫ ДНК

### Диаллельные маркеры ДНК

Среди монолокусных аутосомных маркеров ДНК можно выделить две группы: диаллельные и мультиаллельные. Диаллельные маркеры представлены однонуклеотидными заменами и инсерционно-делеционным полиморфизмом. Мультиаллельные маркеры включают в себе тандемно организованные повторяющиеся последовательности мини- и микросателлитов.

При популяционном анализе диаллельные маркеры сходны по своим свойствам со многими типами классических маркеров, такими как биохимические и некоторые иммунологические. Благодаря этому, данные по диаллельным ДНК-маркерам могут анализироваться традиционными методами математической статистики, для которых детально разработаны способы интерпретации получаемых результатов.

Примером диаллельного полиморфизма ДНК является *инсерционно-делеционный полиморфизм* в гене рецептора хемокинов CCR5. Известно, что рецептор хемокинов является также корецептором для макрофаготропных штаммов вируса иммунодефицита человека ВИЧ-1, т.е. используется данным типом вируса для проникновения в клетки. Ген рецептора CCR5 (обозначаемый *CMKBR5*) локализован в регионе p21.3 хромосомы 3. В 1996 г. в этом гене обнаружена делеция 32 пар нуклеотидов в том сегменте, который кодирует вторую экстрацеллюлярную петлю рецептора CCR5. Данная делеция, по-видимому, препятствует взаимодействию рецептора с вирусом и тем самым определяет устойчивость к инфекции ВИЧ-1.

Предполагается, что люди, гомозиготные по этой делеции, не могут заболеть СПИД, связанным с ВИЧ-1 инфекцией, даже если они входят в группы высоко-



го риска. Мутантный аллель (обозначенный *CCR5Δ32*) обнаружен с частотой от 2 до 15% (в среднем 9%) в европейских популяциях и у белых американцев, тогда как в популяциях коренного населения Африки и Японии он не выявлен. Среди коренного населения континентальной Азии делеция встречалась значительно реже, чем в Европе — ее частота в отдельных популяциях не превышала 5%, а в большинстве популяций она отсутствовала совсем. Таким образом, обнаружено важное свойство этого полиморфизма — *расово-диагностическое*, так как встречаемость аллельных вариантов маркера существенно различается в популяциях разных рас.

В изученных популяциях стран СНГ частота аллеля *CCR5Δ32* колебалась в широких пределах: от 3%—8,5% в пяти азиатских популяциях (тувинцы, уйгуры, азербайджанцы, казахи, узбеки) до 12%—14% в популяциях татар, русских и белорусов [Сломинский и соавт., 2000; Лимборская и др., 2002]. В Волго-Уральском регионе частота делеции составила 7,0% [Галеева и соавт., 1998; Limborskaya et al., 2002].

Очаги с максимальной частотой делеции расположены в северной и восточной части Европы. Появление на севере Европы очагов со значительным накоплением мутантных генов неожиданно — ведь европейское население с вирусом ВИЧ-1 ранее не сталкивалось. Можно предположить, что иные инфекционные агенты также используют рецептор *CCR5* для проникновения в клетки. В этом случае отбор мог привести к накоплению данной мутации в очагах распространения инфекции. Таким образом, наличие или отсутствие делеции является одним из типов полиморфизма, который эффективно может быть использован в популяционном анализе народонаселения.

Анализ гаплотипов данной делеционной мутации у 2500 человек из 18 европейских популяций показал, что она имеет уникальное и сравнительно недавнее происхождение. Авторы предположили, что столь быстрое распространение мутации среди населения Европы говорит о значительном селекционном преимуществе этого аллеля.

Другим примером инсерционно-делеционного полиморфизма может служить ген ангиотензинконвертирующего фермента (АКФ). АКФ или карбоксидипептидилпептидаза (КФ 3.4.15.1) — цинкозависимая пептидаза, катализирующая гидролитическое отщепление дипептидов с карбоксильного конца ряда физиологически активных олигопептидных субстратов. Фермент принимает участие в контроле артериального давления, способствуя образованию сильного вазопрессорного октапептида ангиотензина II из его неактивного предшественника ангиотензина I, а также инактивирует вазодилаторный пептид брадикинин путем двух последовательных гидролитических реакций с отщеплением дипептида.

Ген АКФ расположен на хромосоме 17 (17q23); обнаружен полиморфизм гена АКФ, обусловленный наличием (insertion — I) или отсутствием (deletion — D) Alu-повтора (287 п.н.) в интроне 16. Полиморфизм ассоциирован с уровнем фермента в крови: у лиц, гомозиготных по аллелю *D*, возрастает содержание АКФ, активируется ренин-ангиотензиновая система (РАС). В связи с изменением концентрации циркулирующего и органного фермента изменяется клинический статус. Хотя в последнее время появились работы, вносящие сомнения в вопрос о взаимосвязи генов *РАС* с болезнями, тем не менее, результаты ряда исследований свидетельствуют в пользу взаимосвязи инсерционно-делеционного (I/D) поли-

морфизма гена *АКФ* с эссенциальной гипертензией, ишемической болезнью сердца, инфарктом миокарда, идиопатической дилатационной кардиомиопатией, и другими заболеваниями.

Изучение I/D-полиморфизма в различных регионах мира показало, что он обладает определенными расово-диагностическими свойствами. Делеционный аллель (*D*) встречается у европеоидных народов чаще, чем у монголоидных. В коренном населении Африки частота делеции (*D*) сравнима с ее частотой в европеоидных популяциях и даже порой превышает ее.

Популяции Волго-Уральского региона по частотам генотипа *DD* занимают в определенной степени промежуточное положение между наиболее ярко выраженными европеоидами — популяциями русских, французов, белого населения США [Степанов и соавт., 2000] — и классическими монголоидами (китайцы). Причем, тюркские народы отличаются от финно-угорских меньшей частотой генотипа *DD* [Мустафина, 2000].

Вторым типом диаллельного полиморфизма является так называемый *однонуклеотидный полиморфизм* (ОНП), представляющий собой единичные (точковые) нуклеотидные замены. В геноме человека встречается огромное число таких замен, по некоторым оценкам — десятки миллионов. В некоторых случаях точковые замены происходят в сайтах рестрикции, в результате чего соответствующий фермент не может их опознать. В других случаях, наоборот, точковая замена приводит к возникновению нового сайта рестрикции. Обе эти ситуации позволяют исследователям использовать конкретные рестриктазы для оценки полиморфизма. Воздействие рестриктазы после амплификации интересующего генного фрагмента либо оставляет фрагмент нетронутым (один аллельный вариант), либо разрезает фрагмент на два участка (другой аллельный вариант). Теоретически любые из таких замен могут быть использованы в качестве полиморфных маркеров. Но практически — на сегодняшний день — их используется лишь несколько десятков. В качестве первого примера мы рассмотрим ОНП локусов *MET* и *D7S23*, сцепленных с муковисцидозом.

Ранее были показаны значительные расовые различия аллельного полиморфизма локуса *MET* в населении Северной Америки, а также популяционные особенности аллельного полиморфизма ДНК-локусов *MET* и *D7S23* в населении Северной Евразии и Волго-Уральского региона [Хуснутдинова, 1999].

Например, в популяциях Волго-Уральского региона распределение частот аллелей локуса *MET* хорошо соответствует аллельному полиморфизму данного локуса у жителей Санкт-Петербурга, в популяциях Азербайджана, Белоруссии, Украины, в популяциях Западной Европы и Северной Америки, где частота аллелей приблизительно одинакова. Исключение составляет популяция мордвы, характер аллельного полиморфизма в которой приближается к таковому в популяции Литвы [Баранов с соавт., 1991], где характерно значительное смещение в сторону преобладания аллеля  $A_1$  (0,76). Кроме того, статистически достоверные отличия обнаружены между популяцией удмуртов и другими изученными популяциями СНГ (Азербайджана, Белоруссии и Краснодара). Частота аллеля  $A_2$  в популяции удмуртов почти в два раза выше, чем аллеля  $A_1$ .

При сравнении результатов по различным популяциям можно отметить соответствие аллельного полиморфизма локуса *D7S23* в популяциях Волго-Уральского региона с таковыми в популяциях Литвы, Краснодара, Бурятии и Белоруссии

[Баранов с соавт., 1991]. Вместе с тем, для большинства популяций Волго-Уральского региона выявлены достоверные отличия от населения Санкт-Петербурга, Москвы и Азербайджана, где, как и в популяции мордвы, аллель  $C_1$  встречается вдвое чаще, чем аллель  $C_2$ .

Таким образом, данные подтверждают популяционную неоднородность полиморфных ДНК-локусов *MET* и *D7S23* и свидетельствуют о наличии генетической подразделенности популяций, в том числе Волго-Уральского региона, выраженной в различных вариантах распределения частот полиморфных генотипов. В связи с этим, диаллельные ДНК-локусы *MET* и *D7S23*, фиксирующие популяционную неоднородность, можно считать удобными молекулярно-генетическими маркерами для популяционных исследований.

В качестве другого примера однонуклеотидного полиморфизма можно привести исследования гена рецептора дофамина D2. Известно, что дофамин является одним из ключевых медиаторов нервной системы, участвующих главным образом в передаче возбуждающих импульсов. Обнаружена функциональная, биохимическая и фармакологическая гетерогенность дофаминовых рецепторов, которые разделены на D1-подобные (D1 и D5 подтипы) и D2-подобные (D2, D3 и D4 подтипы) семейства рецепторов. Из них рецептор D2 отличается высоким сродством к психоактивным веществам, особенно к алкоголю, поэтому ген рецептора дофамина D2 рассматривается в качестве одного из основных генов-кандидатов формирования алкогольной зависимости.

У человека ген рецептора дофамина D2 (*DRD2*) находится на хромосоме 11 в области q22-23 и идентифицируется однонуклеотидными полиморфизмами в виде полиморфизма длины рестрикционных фрагментов *Taq1A* (расположен в 3'-некодирующем регионе) и *Nco1* (локализован в экзоне 6). Обнаружены популяционные различия в распределении частот аллелей и генотипов гена *DRD2*. Для *Taq1A* полиморфизма гена *DRD2* частота аллеля *A1* среди белых европейцев в среднем равна 0,25, а в популяциях коренных жителей Японии и Тайваня его частота выше и равна соответственно 0,37 и 0,38 [Chen et al., 1997], что говорит о расово-диагностических свойствах.

Проведен сравнительный анализ *Taq1A* и *Nco1* полиморфизмов гена рецептора дофамина в популяциях Волго-Уральского региона, принадлежащих к тюркской, финно-угорской и восточно-славянской языковым группам. Анализ распределения частот аллелей и генотипов локуса *Taq1A* гена *DRD2* показал достоверные различия между популяцией татар и популяциями башкир, марийцев и мордвы. В изученных популяциях Волго-Уральского региона характер аллельного полиморфизма локуса *Taq1A* гена *DRD2* соответствует таковому в европеоидных популяциях.

Приведенные примеры ОНП являются немногочисленными, но они показывают основные принципы использования этого типа полиморфизма. Теоретическое сходство ОНП с классическими маркерами (диаллельность) позволяет использовать для обработки результатов те же математические подходы. Каждый отдельный ОНП дает довольно легко и наглядно интерпретируемые данные, особенно это хорошо видно при геногеографическом тестировании. Как уже говорилось выше, число ОНП в геноме чрезвычайно велико. Полагают, что со временем появится возможность одновременного тестирования большого их количества. Конечно, основные надежды при этом возлагают на развитие новых техно-

логий, таких как гибридизация с чипами, а также использование высокоразрешающих методов хроматографии [Underhill et al., 1996]. Это, несомненно, приведет к совершенно новым возможностям в популяционных исследованиях, в первую очередь, как ожидают, — в анализе конкретных этапов генетической истории популяций и этносов.

## Мультиаллельные маркеры ДНК

Как уже говорилось выше, мультиаллельные маркеры характеризуются особым типом строения, представленным тандемно организованными повторяющимися последовательностями, в основном, мини- и микросателлитами.

Эти участки генома относятся к так называемым гипервариабельным. Они содержат короткие последовательности ДНК, многократно повторенные один за другим. Для минисателлитов характерны более длинные элементарные звенья от 10 и более нуклеотидов. Например, в известном минисателлитном локусе *DIS80* длина элементарного звена составляет 16 п.н., в интроне миоглобинового гена имеется минисателлит с элементарным звеном в 33 п.н., повторенный несколько раз.

Длина элементарного звена у микросателлитов меньше 10 п.н. В основном исследователи имеют дело с микросателлитами, имеющими размер звена от двух до 4–5 п.н. Эти последовательности ранее называли *простыми повторами*, их число в геноме чрезвычайно велико. Наиболее представленными являются *СА-повторы*, за последнее время в геноме человека выявлено несколько тысяч этих локусов, большая часть которых является вариабельной.

Вариабельность мини- и микросателлитов достигается тем, что у разных людей в одном и том же локусе одной и той же хромосомы число тандемных повторов может различаться. Например, число тандемных повторов в локусе *ApoB* у разных людей может варьировать от 21 до 55, давая в общей сложности 10–14 аллельных вариантов в тех или иных популяциях. Имеются локусы с еще более выраженной мультиаллельностью, так *DIS80* содержит более 25 аллельных вариантов, а *DI4S1* — более 80.

Таким образом, полиморфизм мультиаллельных локусов довольно высок, отсюда следует, что их информативность также должна быть весьма значительной.

Ранее показано, что основным механизмом, ведущим к образованию новых аллельных вариантов мини- и микросателлитов, является неравный кроссинговер, хотя рассматривались также и другие механизмы, в частности, репликативного проскальзывания. Однако в последнее время появились данные, указывающие на то, что рекомбинационные события не являются основной причиной образования новых аллелей мини- и микросателлитов.

Многочисленными исследованиями показано, что скорость мутаций в микросателлитных районах, находящихся на аутосомах, составляет величину  $2 \times 10^{-3}$  [Sajantila et al., 1999]. Приблизительно такая же величина ( $2,8 \times 10^{-3}$ ) определена и для микросателлитных локусов, находящихся в нерекombинирующем районе Y-хромосомы [Kayser et al., 2000]. Равенство величин скорости мутаций для микросателлитов аутосом и Y-хромосомы косвенно указывает на то, что рекомбинации не являются причинами мутаций этих последовательностей, т.е. образования новых аллельных вариантов, отличающихся по длине — по количеству элемен-

тарных звеньев. В то же время само строение микросателлитов позволяет предполагать склонность таких участков к неравному кроссинговеру. Но коль скоро неравный кроссинговер на них не происходит, можно считать, что здесь имеются механизмы, его предотвращающие.

Детальный анализ мутационных событий в микросателлитных локусах показал, что чаще всего происходит добавление или выпадение участка, равного одному элементарному звену (одношаговое изменение). При этом увеличение длины микросателлита происходит примерно в 2,5 раза чаще, чем уменьшение. Отсюда следует, что со временем должна наблюдаться тенденция образования все более длинных аллельных вариантов в локусе. Таким образом, более короткие аллели могут рассматриваться как более древние по сравнению с длинными. Действительно, если сравнивать приматов и человека, то аллельные варианты тех же локусов оказываются у приматов более короткими. Однако необходимо отметить, что тенденция удлинения аллелей наблюдается не для всех локусов — некоторые имеют мутации как удлиняющие, так и укорачивающие аллельные варианты. Обнаружено, что скорость мутаций увеличивается при наличии более длинных микросателлитов, а также, при их сложном строении, т.е. если в их составе более одного типа повторяющегося звена.

Таким образом, можно отметить следующие свойства микросателлитных локусов:

- 1) мутационные изменения, происходящие в них, связаны, по-видимому, с механизмом проскальзывания при репликации;
- 2) мутационные события происходят чаще всего путем добавления или потери одного элементарного звена;
- 3) во многих локусах при мутации имеется тенденция к увеличению длины тандемного повтора, реже — к уменьшению.

Что касается минисателлитных локусов, то для некоторых из них, которые наиболее активно используются в популяционных и идентификационных исследованиях (*ApoB*, *D1S80*, *D17S30* и др.), обнаружены закономерности в мутационных событиях, сходные с таковыми для микросателлитов. Среднее значение скорости мутаций составляло  $0,5 \times 10^{-3}$  (с доверительным интервалом  $0,1-0,9 \times 10^{-3}$ ), что практически совпадает со скоростью мутаций в тетра nukлеотидных микросателлитах —  $0,6 \times 10^{-3}$  (интервал  $0,2-1,0 \times 10^{-3}$ ) [Sajantila et al., 1999]. У минисателлитов также наиболее часто возникают мутации с изменением длины участка на небольшое число повторяющихся единиц (от 1 до 7), независимо от того, каков размер повторяющейся единицы в локусе. Анализ мутационных событий в минисателлитных локусах показывает, что основным механизмом также является проскальзывание цепи во время репликации, и только в редких случаях (теоретически) можно допустить неравный кроссинговер.

Рассмотрим популяционно-генетические свойства мультиаллельных микросателлитных локусов на примере триплетного повтора в гене миотонической протеинкиназы (хромосома 19). Этот повтор находится в некодирующей области гена и известен тем, что его значительная экспансия (удлинение) является причиной миотонической дистрофии — наследственной неврологической болезни [Tishkoff et al., 1996]. В норме число триплетных повторов данного локуса варьирует от 5 до 30 и несколько более. При миотонической дистрофии число повторов достигает сотен и тысяч, образуя гигантские по размеру микросател-

литные участки на хромосоме. По названию этой болезни данный триплетный локус часто обозначают как локус *DM*.

Однако, несмотря на такую тесную связь с наследственной патологией, микросателлитный локус в норме ведет себя как нейтральный маркер и имеет характеристики, делающие его пригодным для популяционных исследований. Количество аллельных вариантов в различных популяциях достигает 20. На рис. 80 (см. вклейку) представлено в качестве примера распределение аллелей данного локуса для трех популяций. Видно, что у русских наиболее часто встречается пятичленный повтор (мажорный аллель), его частота встречаемости в популяциях славян достигает 40, а иногда — 50%. Значимыми аллелями является группа аллелей с числом повторов от 11 до 14, причем соотношения частот внутри этой группы варьируют в различных популяциях в пределах 10–15%. В отдельных случаях частота 13-членного повтора достигает более высоких значений (>20%).

Например, у башкир, как и у многих других уральских народов, встречаемость пятичленного повтора уменьшается — у этих народов вторыми по значимости аллелями являются 12, 13, иногда 14 повторов. Спектр частот существенно отличается, обнаруживая тем самым расово-диагностические свойства данного локуса.

Кроме микросателлитных маркеров, в популяционных исследованиях активно используются минисателлиты. Среди маркеров данного типа одним из наиболее часто применяемых является гипервариабельный локус, находящийся вблизи гена аполипопротеина В (*ApoB*).

Ген *ApoB* расположен в коротком плече хромосомы 2 в регионе 2p23-p24. Он имеет размер 43 т.п.н. и состоит из 29 экзонов и 28 интронов. Основной белок, кодируемый геном, *ApoB*-100, один из самых больших известных белков, имеющий размер 550 кДа. Он входит в состав липопротеидов низкой плотности и играет важную роль в обмене холестерина, обеспечивая его поставку в клетки различных тканей. В 1986 г. у 3'-конца гена был обнаружен тандемный повтор — минисателлит — состоявший из 11 родственных АТ-богатых повторяющихся единиц размером (как тогда полагали) около 15 нуклеотидов. Позднее проведен подробный анализ минисателлита и выявлен его значительный межиндивидуальный полиморфизм. После этого данный маркер стал активно использоваться в криминалистике и популяционных исследованиях. Повторяющимся звеном оказался тандем двух сходных последовательностей длиной 14 и 16 п.н., поэтому соседние аллели отличаются друг от друга на 30 п.н. или на один повтор из двух звеньев при пересчете на число повторов. Различные аллели содержат от 25 до 52 повторов и обозначены в соответствии с числом единиц повтора. В Восточно-Европейском регионе было проведено изучение полиморфизма минисателлитов *ApoB* в значительном числе популяций.

При изучении популяций Восточной Европы, как и в других работах, обнаружены минорные аллели с нечетным числом повторов: 25, 29 и 37 [Lahermo et al., 1996]. В разных популяциях выявляются от 10 до 17 различных аллельных вариантов. Хотя частоты аллелей в разных популяциях мира значительно варьируют, прослеживаются общие черты в их распределении. Как правило, два аллельных варианта *ApoB34* и *ApoB36* встречаются максимально часто (суммарная частота их встречаемости равна 60–80%), один или два аллельных варианта встречаются немого реже (обычно это вариант *ApoB46*, *ApoB30* или *ApoB48* с частотами от 10% до 20%), остальные аллели встречаются с частотой менее 5%.

Изучение полиморфизма гена *ApoB* в популяциях Волго-Уральского региона показало, что распределение частот аллелей данного локуса значительно варьирует в исследованных популяциях (см. вкл. рис. 81). Наиболее частыми аллелями являются аллели 34 и 36; аллель 34 преобладает в популяциях башкир и татар, аллель 36 — в остальных исследованных популяциях. Согласно литературным данным, преобладание аллеля 34 выявлено в популяциях саамов [Lahermo et al., 1996], выходцев из Южной Азии, папуасов Новой Гвинеи, индейцев Качари (Индия), индейцев Канады. Во всех же исследованных популяциях европеоидов Северной Америки, Европы, включая Россию, превалирующим является аллель 36 [Котлярова и соавт., 1995; Погода и соавт., 1995; Lahermo et al., 1996]. Таким образом, минисателлит *ApoB* обладает выраженным расово-диагностическим свойством. Интересно, что в популяциях негроидной расы выявлена особенно высокая вариабельность минисателлитного локуса *ApoB*. Число аллелей в популяциях варьирует от 11 до более чем 20, количество нечетных аллелей значительно больше, чем в европеоидных и монголоидных популяциях. Соотношение частот встречаемости аллелей 34 и 36 сходно с европеоидным (аллель 36 встречается чаще, чем аллель 34), но сами частоты этих аллелей значительно ниже, чем у европеоидов (0,15–0,25, вместо 0,25–0,42).

Еще одна особенность распределения аллельных частот *ApoB*, которую можно трактовать как расово-диагностический признак, это — модальность. У европеоидов наряду с пиком частот аллелей 34 и 36 имеется еще один пик — в районе 48, который может достигать величины 10%. Таким образом, у европеоидов, как правило, распределение аллельных частот носит бимодальный характер. В отличие от них, частотное распределение исследуемых аллелей среди монголоидов и негроидов не обнаруживает второго пика и характеризуется унимодальностью.

В Волго-Уральском регионе для одних популяций выявлено распределение частот аллелей локуса *ApoB*, характерное для европеоидных народов, для других популяций — свойственное монголоидным народам.

Сравнительный анализ частот распределения аллельных вариантов локуса *ApoB* в популяциях Волго-Уральского региона с литературными данными позволил выявить значительные различия между популяциями Волго-Уральского региона и русскими, финнами, саами и популяциями Южной Азии.

Следует отметить, что полученные данные об аллельном полиморфизме локуса *ApoB* могут иметь значение не только для популяционной генетики, но и для медицинской генетики человека в плане выявления факторов риска развития сердечно-сосудистых заболеваний. В литературе имеются данные о распределении аллельных вариантов 3'-минисателлита гена *ApoB* у больных с ишемической болезнью сердца (ИБС) по сравнению с контролем для ряда популяций европеоидов, однако результаты, которые были получены, оказались неоднозначными. Одни авторы при обследовании жителей Австрии обнаружили, что в группе больных ИБС несколько чаще встречаются аллельные варианты с 38, 44, 46 и 48 повторами; в то же время другим — не удалось выявить каких-либо заметных различий в частотах аллелей у больных ИБС по сравнению с контролем при обследовании жителей Англии и Швеции. Такая неоднозначность может быть обусловлена генетическими и этническими различиями между популяциями, хотя не исключаются и другие причины (например, особенности формирования выборки исследуемых больных).

Важным параметром полиморфной системы, характеризующим как ее информативность при использовании в популяционно-генетических исследованиях, так и генетическую структуру популяций, является *гетерозиготность*.

Наиболее высокие значения фактической гетерозиготности (73% и 70%) среди исследованных популяций Волго-Уральского региона выявлены в популяциях мордвы и коми и соответствуют таковым в европеоидных популяциях, описанных в литературе. В других популяциях этот показатель оказался несколько ниже. Наименьшее его значение — 59,36%, установлено в популяции башкир и соответствует таковым в популяциях монголоидов Японии и области Качари Северной Индии. При этом в различных этно-территориальных группах он варьирует от 52,46% до 72,54%.

Таким образом, результаты анализа полиморфизма гипервариабельного локуса АроВ свидетельствуют о высокой информативности данного локуса для популяционно-генетических исследований на уровне этнических групп в силу их мультиаллельности и высокой гетерозиготности в популяциях.

Другими минисателлитными локусами, часто используемыми в популяционных и идентификационных исследованиях, являются *DIS80*, *DXS52*, *hSERT*.

## Мультилокусные маркеры ДНК

Помимо тех типов полиморфизма, о которых говорилось выше, имеется еще один, реже используемый в популяционных исследованиях, но являющийся достаточно эффективным. Этот полиморфизм выявляется с помощью так называемых мультилокусных маркеров, которые по своей природе являются мини- и микросателлитами и именно с него начались активные исследования межиндивидуальной вариабельности генома, когда были заложены основы этногеномики.

В 1985 г. появились работы Джеффриса и соавт., в которых в одном из интронов миоглобинового гена человека был обнаружен минисателлит, представляющий собой четырехкратный повтор, состоящий из 33 нуклеотидов. Используя этот минисателлит в качестве зонда, авторы выделили из геномной библиотеки человека и охарактеризовали несколько гипервариабельных последовательностей. Все они также оказались минисателлитами с числом повторяющихся единиц от трех до 29. Сами единичные звенья, хотя и были сходны между собой, имели некоторые различия по нуклеотидному составу и варьировали по длине от 16 до 64 п.н. Сходство их состояло в том, что все повторяющиеся звенья внутри себя содержали практически одинаковую 15-нуклеотидную последовательность, названную авторами «кор-последовательностью». Блот-гибридизация любого из таких участков с рестрицированной геномной ДНК обнаруживала картину множественной гибридации, т.е. оказалось, что таких локусов в геноме множество. Полиморфизм картин блот-гибридации был чрезвычайно высоким, в связи с тем, что он определялся комбинацией большого числа независимых гипервариабельных локусов. У каждого человека выявлялся свой индивидуальный рисунок (паттерн) гибридации; вероятность совпадения картин двух неродственных индивидуумов была чрезвычайно низка и составляла примерно  $10^{-11}$ .

Таким образом, этот метод по точности разрешения превращал классический метод отпечатков пальцев, используемый в дактилоскопии, где вероятность случайного совпадения, хотя и чрезвычайно мала —  $10^{-6}$ , но все-таки выше на не-



сколько порядков, чем при мультилокусном тестировании ДНК. По аналогии с классической дактилоскопией, метод мультилокусного анализа ДНК был назван *геномной дактилоскопией* или *ДНК-фингерпринтингом*, а картины блот-гибридизационного анализа этих локусов — *ДНК-фингерпринтами*. Такого рода анализ стал активно использоваться в судебно-медицинской практике для установления родства и идентификации личности.

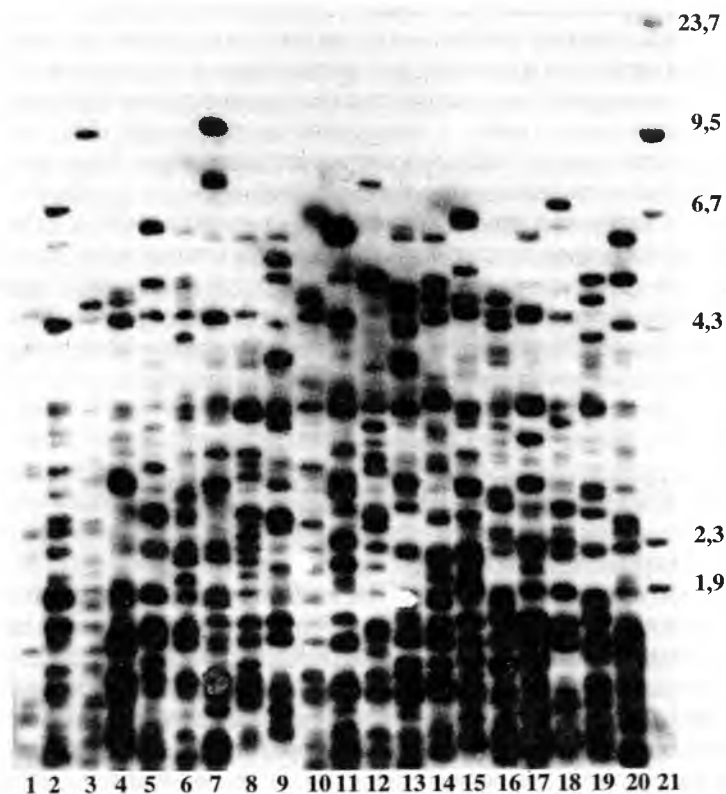
Позднее двумя независимыми группами исследователей — Рысковым с соавт. в нашей стране [Рысков, 1999] и Вассаром с соавт. в Бельгии — было обнаружено другое семейство гипервариабельных участков с множественной локализацией в геноме, которое выявляется с помощью ДНК фага M13. Внутри молекулы ДНК фага M13 имеются два небольших участка, являющиеся типичными минисателлитными последовательностями с размером элементарного звена в 15 нуклеотидов. В одном участке генома фага 15-членное звено повторяется 10 раз, в другом — четыре раза. Первичная структура этого элементарного звена сильно отличается от кор-последовательности минисателлитов Джеффриса. Отсюда следует, что данный зонд детектирует другой класс гипервариабельных участков, отличающийся от семейства минисателлитов Джеффриса. Использование ДНК фага M13 как природного зонда для блот-гибридизации с рестриктированной ДНК показало множественный характер гибридизации и высокий уровень межиндивидуального полиморфизма, сравнимого с таковым для минисателлитов Джеффриса. Показано, что минисателлиты M13 обладают свойством универсального распространения в живой природе, они обнаружены у микроорганизмов, растений и животных, включая человека. Это обусловило широкое их использование во многих областях биологии и медицины, в том числе для анализа популяций редких и исчезающих видов животных; для характеристики природных штаммов возбудителей холеры, чумы, легионеллеза, псевдотуберкулеза; для видовой идентификации паразитических гельминтов, фитопатогенных грибов и т.д.

Однако имеются сложности в генетической интерпретации данных, поскольку нет критериев, с помощью которых можно относить наблюдаемые полосы к аллелям одного или разных локусов. В самое последнее время разрабатывается математический аппарат, пригодный для геномного анализа и позволяющий получить приемлемую генетическую интерпретацию [Zhivotovsky, 1999].

Вскоре после обнаружения мультилокусных зондов сделана попытка использовать их в популяционных исследованиях. Оказалось, что эти зонды, несмотря на чрезвычайно высокий межиндивидуальный полиморфизм, выявляемый с их помощью, могут быть применены для анализа популяций (рис. 82). Первое использование минисателлитов M13 для анализа популяций человека осуществлено в работах Барышевой и соавт., где была охарактеризована краснодарская популяция, являющаяся весьма гетерогенной.

В дальнейших работах с помощью такого же подхода исследовали ряд других популяций — тувинцев, русских Кировской области и г. Краснодара, а также Волго-Уральского региона, показана пригодность метода для оценки генетических расстояний между популяциями, в том числе различного этнического и расового состава [Хидиятова с соавт., 1993].

Широкий популяционный полиморфизм множества участков генома, открываемый одновременно с помощью единственного ДНК-зонда, — основное преимущество, предполагающее получение богатой информации при использовании



**Рис. 82.** Полиморфные BspRI-фрагменты ДНК человека, выявляемые при гибридизации с ДНК-зондом фага M13

1–20 – «фингерпринты» отдельных индивидуумов, 21 – маркер молекулярной массы – фрагменты ДНК фага, рестриктированной *Hind*III, (размер фрагментов указан в т.п.н.)

такой полиморфной системы в популяционно-генетических исследованиях. Однако недостатком метода является отсутствие генетической интерпретации происхождения фрагментов на получаемых картинах гибридизации, что не позволяет работать с конкретными локусами, определенным числом их аллелей и применять традиционные методы популяционно-генетического анализа.

Аналогично предыдущим исследованиям, представленные результаты по популяциям Волго-Уральского региона показали, что паттерн гибридизации выявляет аллели некоторых, не сцепленных друг с другом гиперварибельных локусов, причем в анализируемой зоне от 1,7 до 10 т.п.н. располагается лишь один аллель данного локуса. Это позволяет рассматривать фингерпринт как результат независимой комбинации одиночных аллелей некоторых гиперварибельных локусов, а частоты полос – как удвоенные частоты аллелей.

Так, в четырех этно-территориальных группах башкир, чувашей, удмуртов, марийцев, мордвы и коми при изучении полиморфизма ДНК, выявляемого ме-

тодом геномной дактилоскопии на основе ДНК фага M13, были установлены достоверные популяционные различия как по оценке среднего числа фрагментов гибридизации индивидуума, так и по распределению частот некоторых фракций. В восьми из 10 исследованных популяций обнаружен фрагмент размером около 3,4 т.п.н., частота которого равна 1, в двух популяциях — 0.98. Средние значения показателя сходства внутри каждой популяции и между популяциями оказались приблизительно идентичными и соответствуют данным по другим популяциям.

Дальнейшим шагом в популяционных исследованиях человека с помощью мультилокусных маркеров явились работы Калнина и соавт. и Рыскова [Kalnin et al., 1995; Рысков, 1999], где использованы методы многомерного статистического анализа для обработки популяционных данных. В этих работах показано, что мультилокусные маркеры могут успешно дифференцировать популяции, относящиеся к различным этно-территориальным группам.

### 9.3. ПОЛИМОРФИЗМ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК ЧЕЛОВЕКА

Полиморфизм митохондриальной ДНК (мтДНК) в современных популяционно-генетических исследованиях находит все более широкое применение благодаря особенностям структурной организации мтДНК и характеру ее наследования.

Митохондриальный геном человека представлен кольцевой молекулой ДНК размером 16569 п.н., которая наследуется по материнской линии и не рекомбинирует. Каждая митохондриальная ДНК кодирует синтез 13 полипептидов, которые являются компонентами энзиматических систем окислительного фосфорилирования митохондрий, а также гены двух рибосомных и 22 транспортных РНК. Кодирующие области мтДНК не имеют интронов и разделены короткими (длиной от одного до нескольких нуклеотидов) межгенными некодирующими участками, для которых характерен высокий уровень полиморфизма, обусловленный, преимущественно, однонуклеотидными заменами.

Преимущества использования мтДНК для популяционно-генетического анализа объясняются следующими факторами:

1. Высокая скорость накопления мутаций мтДНК увеличивает вероятность фиксации мутаций мтДНК и позволяет реконструировать филогенетические модели. Скорость дивергенции мтДНК составляет приблизительно 2–4% за 1 млн лет, что в среднем в 10–20 раз превышает скорость мутирования аутосомных локусов ядерного генома. Одной из основных причин высокой скорости накопления мутаций в мтДНК является отсутствие эффективных систем репарации мутационных повреждений. Вследствие этого анализ изменчивости мтДНК позволяет получать информацию о сходстве и различиях между этно-территориальными группами человека, что является необходимым условием как для изучения процессов дифференциации человечества в далеком прошлом в периоды расообразования, так и для анализа относительно недавней демографической истории стран и континентов.

2. Наследование мтДНК у человека по материнской линии и отсутствие рекомбинации обуславливают уменьшение эффективного размера ( $N_e$ ) митохонд-

риального генома по сравнению с аутосомными локусами. Меньший эффективный размер понижает «чувствительность» мтДНК к флюктуациям численности популяций и позволяет выявлять периоды резкого роста численности, что не всегда доступно при анализе ядерных маркеров с трех- (X-хромосома) или четырехкратно большим эффективным размером.

3. Селективная нейтральность маркеров мтДНК является необходимым условием для многих способов филогенетического анализа. Теория о нейтральной эволюции мтДНК позволила использовать информацию о полиморфизме мтДНК в анализе сходства и различий между популяциями и видами, в определении времени дивергенции мтДНК, которое может в некоторой степени соответствовать времени дивергенции между популяциями и видами.

Существующее неравновесие по сцеплению между мутациями в митохондриальном геноме позволяет рассматривать молекулу мтДНК как единый локус, представленный множеством аллелей — митотипов, определенные группы которых соответствуют группам сцепления между конкретными мутациями. Эта особенность молекул мтДНК оказалась очень полезной в плане изучения молекулярной эволюции, так как благодаря ассоциативности мутаций разнообразие митохондриального генофонда хранит в себе множество комбинаций мутаций, по которым можно проследить изменения молекул мтДНК во времени и классифицировать молекулярные изменения в связи с эволюцией популяций.

Регион V мтДНК относится к числу наиболее информативных генетических маркеров, представляющих интерес в области изучения эволюционной истории популяций монголоидного происхождения и процессов заселения Сибири и Америки. В популяциях человека зарегистрирован полиморфизм, связанный с отсутствием одной копии повтора (делеция 9 п.н.) или наличием инсерций, состоящих из четырех цитозинон или третьей копии повтора. В ходе изучения данного полиморфизма сложилось представление о многократном, независимом возникновении делеции 9 п.н. в процессе эволюции человека. Так, митохондриальный генофонд человечества включает делетированные мтДНК негроидного, европеоидного, полинезийского и азиатского континентального типов [Tonfoni, 1995].

Однако наиболее варибельным участком мтДНК человека является главная некодирующая область (D-петля, петля смещения, контрольный регион). Контрольный регион мтДНК имеет протяженность 1122 п.н. между позициями 16024 п.н. и 16576 п.н. и расположен между генами тРНК(Pro) и тРНК(Phe). Наиболее варибельной частью контрольного региона мтДНК является левый домен, расположенный между позициями 16024 п.н. и 1640 п.н. Его локализация совпадает с расположением гиперварибельного сегмента I (ГВСI) мтДНК. Варибельность контрольного региона мтДНК человека обусловлена, главным образом, точковыми нуклеотидными заменами, короткими делециями и инсерциями. Показано, что главная некодирующая область мтДНК млекопитающих эволюционирует примерно в 10 раз быстрее по сравнению с ядерной ДНК и в большей степени соответствует представлениям о селективно-нейтральном характере эволюции. Таким образом, данные о полиморфизме этого региона могут использоваться в исследованиях истории видов и популяций, анализе вопросов происхождения и дифференциации рас человека.

Потенциальными маркерами для популяционно-генетического анализа мтДНК служат типы мтДНК, образованные сочетаниями рестрикционных вариантов. По-

сколькo существует значительная вариабельность мтДНК среди индивидуумов, рестрикционный анализ мтДНК с использованием набора рестриктаз *Bam*HI, *Avall*II, *Hpa*II, *Hae*II, *Eco*RV, *Rsa*I стал полезным инструментом в выяснении эволюционных взаимоотношений между этническими группами человека. Результаты таких исследований подтвердили, что существует высокая степень корреляции между митотипами рестрикции и этническим происхождением индивидуумов.

Интенсивные популяционно-генетические исследования в 1980–1990-х гг. увеличили объем знаний об изменчивости мтДНК человека. В 1981 г. были описаны основные расовые и популяционно-специфические типы мтДНК. Так, для европеоидов рестрикционные типы мтДНК можно подразделить на четыре гаплогруппы с маркерными сайтами для *Dde* I в позиции 10394 п.н. и 1715 п.н., для *Hinf* I/*Bst* MI – в сайтах 16065/13704 п.н., для *Hae* II – в сайте 9052 п.н. У населения Юго-Восточной Европы с высокой частотой обнаружена гаплогруппа *Bam*HI I-3/*Msp*I-4. Для монголоидных типов мтДНК оказалась характерна ассоциация замечен в сайтах 10394 п.н. (*Dde*I), 10397 п.н. (*Alu*I), 12406 п.н. (*Hpa*I-1, G-A) [Torgoni, 1996]. Описан маркер для мтДНК негроидов *Hpa*I-3 (замена С-Т в сайте 3592 п.н.).

В последние годы изучение изменчивости митохондриального генома ведется на качественно новом уровне определения первичной нуклеотидной последовательности мтДНК. Использование метода прямого секвенирования главной некодирующей области мтДНК позволяет проводить комплексный анализ полиморфизма мтДНК в популяциях человека, наряду с использованием ПДРФ-анализа. Такой подход выявил важную особенность молекул мтДНК, имеющую значение для изучения молекулярной эволюции. Обнаружено, что определенным группам рестрикционных типов мтДНК, ключевые мутации которых расположены в различных участках молекулы, соответствуют вполне определенные типы нуклеотидных последовательностей контрольного региона мтДНК. Существующее неравновесие по сцеплению между мутациями в митохондриальном геноме позволяет рассматривать молекулу ДНК как один локус, представленный множеством аллелей – митотипов, определенные группы которых соответствуют определенным группам сцепления между конкретными мутациями. Эти два подхода (анализ нуклеотидных последовательностей и ПДРФ-метод) были положены в основу классификации и филогении гаплогрупп всего митохондриального генома современного человечества.

Первая классификация типов мтДНК по данным секвенирования контрольного региона была предложена в 1996 г. [Richards et al., 1996]. Согласно этой классификации европеоидные типы мтДНК составляют пять гаплогрупп, эволюционный возраст которых оценивается примерно в 40 000 лет.

Современная классификация митохондриального генома основана на объединении данных по разнообразию нуклеотидных последовательностей контрольного региона [Richards et al., 1996] и ПДРФ-анализа [Torgoni, 1996].

В первых работах с использованием метода ПДРФ идентифицированы специфические для европейцев гаплогруппы мтДНК – H, I, J, K [Torgoni et al., 1996]. Дополнительные результаты исследований, основанные на данных секвенирования ГВСI, ГВСII и рестрикционного анализа всего митохондриального генома, показали широкое распространение этих четырех гаплогрупп среди европейцев и выявили дополнительные гаплогруппы T, U, V, W, X. Эти девять гаплогрупп, охватывающие более 90% мтДНК жителей Европы, высоко специфичны для на-

селения Западной Евразии и совместно с азиатской супергаплогруппой М и африканскими гаплогруппами L1 и L2, представленными с низкими частотами, полностью представляют митохондриальный генофонд Европы [Torroni et al., 1997].

*Медианная сеть* — это один из графических вариантов представления данных по полиморфизму ДНК, который позволяет проследить дивергенцию определенной хромосомы от предковой последовательности.

На рис. 83 представлена медианная сеть, отражающая филогению гаплогрупп митохондриального генома всего человечества. Как видно, центральное место на рисунке принадлежит суперкластеру L3 — предковой последовательности для всех неафриканских типов мтДНК [Watson et al., 1997]. Дериваты гаплогруппы L3 включают кластеры, специфичные для Западной Африки (L1, L2), Азии (М) и кластер R, характеризующийся глобальным распространением во всем мире. Рассмотрим особенности филогении типов мтДНК в различных регионах мира.

Все европейские гаплогруппы исходят из одного общего узла — N. Помимо европейских, этот суперкластер включает гаплогруппы, специфичные для азиатских популяций (А, В, F и Y), указывая, тем самым, на единый источник происхождения. От суперкластера N отделяется большая ветвь — R, определяемая транзциями в позициях 12705 и 16223. В этом кластере выделяют пять гаплогрупп: H, J, T, V и U. Позднее в самостоятельную гаплогруппу была выделена гаплогруппа K. Гаплогруппы H и V имеют общий предковый узел, названный HV [Macaulay et al., 1999].

Филогенетический анализ, изучение митотипического разнообразия и географического распространения гаплогрупп мтДНК в популяциях Западной Евразии привели авторов к заключению, что предки большинства ныне существующих линий мтДНК попали в Европу в период верхнего палеолита [Richards et al., 1996]. Две поздние волны миграций в период неолита, связанные с распространением агрокультуры, не оказали существенного влияния на митохондриальный генофонд европейских популяций.

Результаты исследований изменчивости мтДНК населения нашей страны представлены в ряде работ отечественных генетиков. При изучении рестрикционного полиморфизма мтДНК у русского населения северо-восточной части России авторами отмечен высокий уровень разнообразия митотипов и показано, что для русских характерны рестрикционные варианты, присущие монголоидам и не выявленные у европеоидов, что, по мнению авторов, является следствием генетической неоднородности русского населения Западной Сибири. ПДРФ анализ контрольного региона мтДНК у славянского населения центральных и южных областей России также показал высокий уровень разнообразия мтДНК [Петришев, Кутуева, 1993].

В популяциях балкарцев и осетин выявлен низкий уровень ПДРФ главной некодирующей области мтДНК [Рычков с соавт., 1995]. Авторы делают вывод о происхождении осетин от ограниченного числа женщин.

Сходные данные о высокой гетерогенности мтДНК славян получены в выборке лиц русской национальности Западной Сибири. Выявленные типы ГВС1 преимущественно распространены у европеоидов Ближнего Востока и Южной Европы. Наличие в славянском генофонде типов мтДНК, содержащих нуклеотидные замены, характерные для монголоидов, автор объясняет ассимиляцией, про-

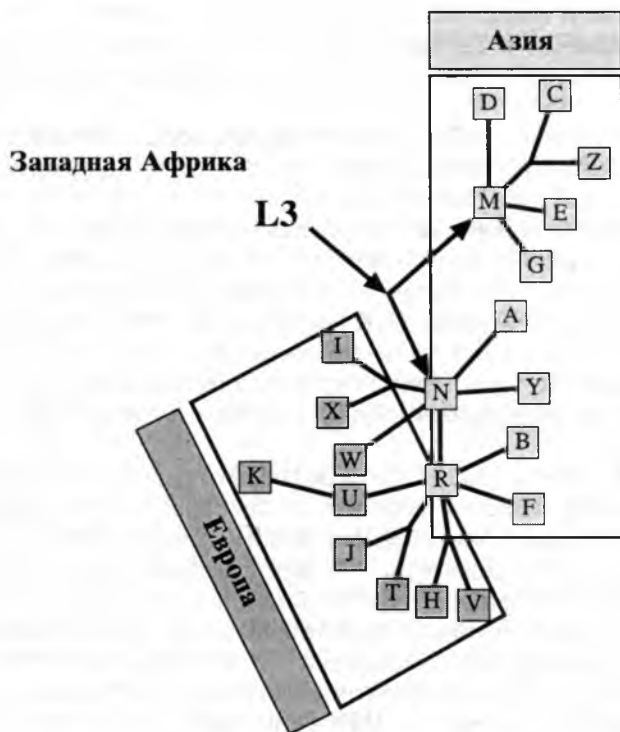
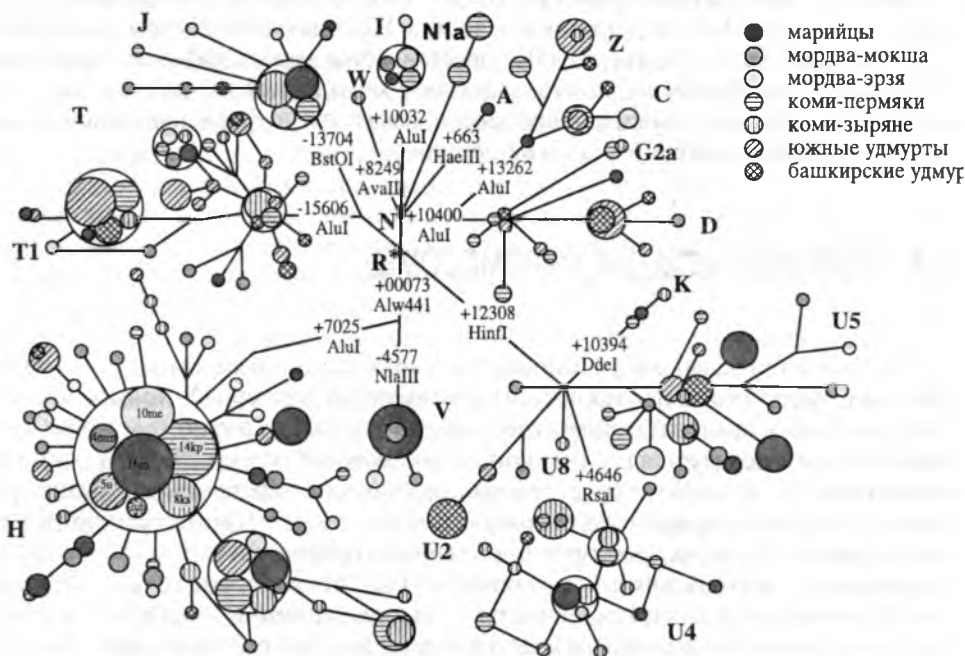


Рис. 83. Классификация гаплогрупп мтДНК в популяциях народов мира

исходящей в процессе формирования славянского населения России. Результаты секвенирования контрольного региона мтДНК в выборке лиц русской национальности из центральных областей России указывают также на некоторое влияние финно-угорского компонента на митохондриальный генофонд русских.

Анализ распределения филогенетически родственных линий ГВС1 мтДНК у населения Европы показал, что славяне в целом характеризуются общностью происхождения, а центральное положение среди них занимают западные славяне. Генофонд западных славян включает максимальное число филогенетически родственных типов мтДНК по отношению к генофондам восточных славян (русских) и южных славян, в то время как последние две группы не обнаруживают высокого генетического сходства. Этот факт авторы объясняют независимыми миграциями славян с территории предполагаемой центрально-европейской прародины на юг и восток Европы.

Изучение изменчивости мтДНК в популяциях девяти коренных народов Сибири и Средней Азии (тувинцы, буряты, алтайцы, эвенки, якуты, киргизы, узбеки, таджики) позволило выявить [Степанов и др., 2000] наибольшее разнообразие в среднеазиатских популяциях. По спектру и частотам гаплогрупп мтДНК исследованные популяции разделяются на две основные группы. В генофонде



**Рис. 84.** Медианная сеть гаплотипов мтДНК в популяциях Волго-Уральского региона (А – тюркских народов, В – финноугорских народов).

киргизов и узбеков, а также алтайцев присутствуют со значительной частотой как «европеоидные», так и «монголоидные» гаплогруппы мтДНК. Популяции Сибири характеризуются преобладанием линий мтДНК монголоидного происхождения.

При изучении полиморфизма мтДНК в восьми популяциях Волго-Уральского региона (башкир, татар, чувашей, русских, удмуртов, марийцев, коми и мордвы) показано преобладание гаплогрупп, принадлежащих к европейским линиям. Наряду с этим, существенная доля азиатских гаплогрупп выявлена по материнской линии в популяциях башкир и удмуртов [Бермишева и др., 2002] (рис. 84). Обнаружение у удмуртов низкого уровня разнообразия мтДНК дало авторам основание высказать предположение о роли генетического дрейфа в демографической истории этого этноса.

Недавно проведена работа по изучению последовательностей контрольного региона мтДНК у российских немцев и показано, что данная этническая группа за время проживания на территории России сохранила основные особенности митохондриального генофонда населения Центральной и Западной Европы. Однако в отличие от европейцев в генетической структуре мтДНК алтайских немцев представлены варианты, являющиеся предковыми для основных гаплогрупп, которые не были обнаружены у современного населения Центральной и Западной Европы [Баранов с соавт., 1999]. Авторы делают заключение, что немцы, проживающие на территории России, находясь в некоторой изоляции, вероятно, в большей мере смогли сохранить структуру предкового генофонда мтДНК.



Таким образом, к настоящему времени получена обширная информация о вариабельности мтДНК в популяциях человека. Исследование последовательности ГВС1 контрольного региона мтДНК представляется весьма эффективным подходом к получению молекулярно-генетической характеристики популяций, а также к пониманию исторических процессов, связанных с формированием народностей и характером их миграций в прошлом.

## 9.4. ПОЛИМОРФИЗМ ДНК Y-ХРОМОСОМЫ

Для решения задач популяционной и эволюционной генетики все большее значение приобретают исследования полиморфных маркеров Y-хромосомы. Как уже говорилось выше, эта хромосома содержится только в геноме мужчин и, таким образом, наследуется по мужской линии. Важной особенностью Y-хромосомы является то, что более 95% ее длины представлено нерекombинирующим участком. К настоящему времени в этом участке выявлено 20 генных семейств. Среди них девять генов экспрессируются во многих органах и тканях. Остальные гены являются дублированными, причем 11 из них работают только в тестикулах. Картирование Y-хромосомы с помощью делеционных мутаций показало, что гены нерекombинирующего участка играют важную роль в детерминации пола, роста, сперматогенеза.

Долгое время считалось, что уровень полиморфизма Y-хромосомы значительно ниже вариабельности аутосом и мтДНК. Однако впоследствии оказалось, что степень полиморфизма самой маленькой хромосомы генома человека вполне сопоставима с уровнем полиморфизма аутосомных локусов. Геномная база данных (Genome Data Base) сейчас содержит информацию о более чем 400 генетических маркерах, расположенных в разных участках Y-хромосомы, среди которых широко представлены как однонуклеотидные замены (SNP), так и вариабельные по числу короткие tandemные повторы (STR).

Если первый тип полиморфизма определяется весьма редкими мутационными событиями, то последний, напротив — связан с быстро мутирующими локусами. Эти различия могут быть использованы для исследования эволюционных вопросов, связанных с различными шкалами времени. Если медленно эволюционирующий полиморфизм может определить, как соотносятся группы хромосом с предковыми исходными формами, то микросателлитный полиморфизм может быть использован для оценки разнообразия внутри этих групп, а также для выявления различий между близкородственными популяциями.

В определенной степени Y-хромосома в качестве средства популяционно-генетических исследований сходна с мтДНК, но по сравнению с митохондриальным геномом, размером около 16,5 т.п.н., Y-хромосома, размер которой оценивается приблизительно в 60 млн п.н., дает в руки исследователей потенциально более мощное оружие.

Большие возможности Y-хромосомы как инструмента для эволюционных исследований связаны с ее так называемой гаплоидностью. Она содержится в диплоидном геноме в одном экземпляре и на 95% своей длины не вовлечена в реком-

бинационные процессы, при которых в других хромосомах происходит обмен информацией между аллелями, имеющими разное историческое происхождение. Таким образом, только спонтанный мутационный процесс играет роль в изменении Y-хромосомы, и она передается из поколения в поколение в более постоянном виде по сравнению с другими участками генома, а именно в виде единого гаплотипа, представленного сочетанием большого числа полиморфных аллелей.

Еще одной важной особенностью Y-хромосомы при изучении популяций является ее эффективный популяционный размер, который в четыре раза меньше, чем для любой из аутосом. Это означает, что генетический дрейф влияет на Y-хромосому в значительно большей степени. Обнаружена еще одна очень важная популяционная характеристика Y-хромосомы, связанная с малым эффективным размером, — ее очень высокая степень географической дифференциации по сравнению с другими участками генома.

На основании этих свойств Y-хромосомный полиморфизм расценивают как чувствительную систему для определения популяционных передвижений в пределах больших регионов и континентов. Детальный анализ генетической структуры Y-хромосомы показал, что 59% ее генетического разнообразия приходится на межиндивидуальные различия, 25% — на межпопуляционные и 16% — на разнообразие между географическими регионами. Таким образом, суммарная оценка межгрупповых различий (41%) значительно выше по маркерам Y-хромосомы, чем оценка межгрупповых различий (15%), полученная для ДНК-полиморфизма аутосом. Столь высокие показатели межпопуляционного и межгруппового разнообразия Y-хромосомы (41%) подчеркивают перспективность анализа ее гаплотипов для выявления различий между популяциями и при изучении миграций внутри континентов.

Учитывая, что локусы нерекombинирующей области Y-хромосомы не наследуются независимо и представляют собой единый гаплотип, можно использовать частоты конкретных гаплотипов для оценки аналогов  $F_{st}$  и генетических расстояний между популяциями. Однако, если использовать только частоты гаплотипов (считая Y-хромосому единым «локусом»), то можно потерять информацию об общности происхождения гаплотипов. Чтобы этого не случилось, при оценке сходства популяций, связанных родством по происхождению, необходимо учитывать не только частоты гаплотипов, но и молекулярные различия между гаплотипами. С этой целью используют различного рода методы, в том числе — *метод медианных сетей*. В настоящее время анализ гаплотипов Y-хромосомы позволяет решать популяционные и эволюционные задачи различного масштаба — от характеристики мирового генофонда, реконструкции ранних этапов эволюции и расселения современного человека, до анализа уровня генетической дифференциации близких популяций.

Одним из аспектов применения полиморфизма Y-хромосомы является анализ диаллельных локусов, на основе которого были выделены специфические группы Y-хромосом и реконструировано филогенетическое древо (рис. 85) [Jobling et al., 1998].

При секвенировании интрона в гене *ZFY* нерекombинирующей части Y-хромосомы у 38 мужчин различной расовой принадлежности не обнаружено ни одного полиморфного сайта. Сравнение этой последовательности между человеком и приматами (шимпанзе, гориллой и орангутангом) выявило у них значительные раз-

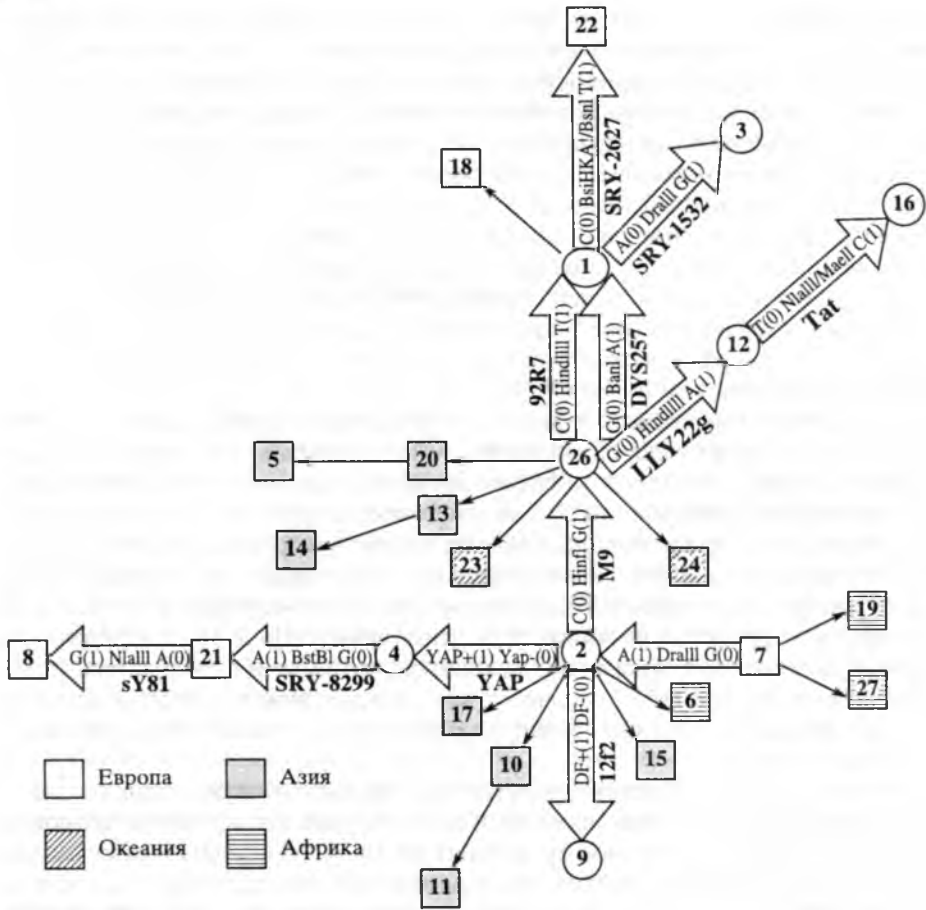


Рис. 85. Классификация гаплотипов Y-хромосомы

личия. Анализ изучения полиморфизма Y-хромосомы позволил авторам оценить возраст предковой Y-хромосомы для всех человеческих рас примерно в 270 000 лет.

При изучении эволюции другого гена Y-хромосомы — *SRY* было обнаружено, что при сравнении этого гена между видами он эволюционирует очень быстро, но внутри одного вида наблюдался очень низкий уровень изменчивости. Причиной этого факта авторы считают отсутствие рекомбинации Y-хромосомы. Аллели, подвергающиеся действию отбора, будут «тянуть» за собой весь участок нерекombинирующей части Y-хромосомы (эффект «движения в повозке», т.е. в популяции происходит распространение нейтрального аллеля за счет его тесного сцепления с другим аллелем, имеющим селективное преимущество). Результатом такого поведения Y-хромосомы будет гомогенизация генофонда Y-хромосомы у конкретного вида.

Секвенирование участка Y-хромосомы размером 2,6 т.п.н., включающего в себя *Alu*-инсерцию (YAP), в образцах ДНК 16 мужчин и 4 шимпанзе позволило установить, что данный полиморфизм возник однажды после дивергенции челове-

ка и шимпанзе, и оценить возраст предковой Y-хромосомы человека примерно в 188 000 лет [Hammer, 1994]. Такие расчеты соответствуют оценкам возраста предкового типа мтДНК человека (около 200 000 лет).

Анализ распространения YAP-элемента Y-хромосомы в популяциях мира показал, что полиморфизм четко отражает миграцию мужчин из Африки в Европу и Японию [Hammer, 1994]. В этой работе был рассчитано начальное эффективное количество мужского населения, равное приблизительно 5000 человек. Полагают, что такая оценка опровергает гипотезу о мультирегиональном происхождении человека, так как огромные территории Африки, Азии, Европы не могли быть непрерывно заселены таким малым количеством индивидуумов.

Однако подобные выводы и применяемая методология подвергаются значительной критике, главным образом, вызывают сомнения предположения о мутационной скорости, эффективном размере популяций и динамике популяционного роста в истории человечества.

Выдвигаются различные версии для объяснения низкой нуклеотидной вариабельности в нерекombинирующем участке Y-хромосомы. Некоторые исследователи утверждают, что географическая гомогенность Y-хромосомы является следствием действия селективного отбора в недавнем историческом прошлом (эффект «движения в повозке»), в результате чего устраняются все «древние» линии Y-хромосомы.

Различие между наблюдаемым и предсказанным уровнем разнообразия Y-хромосомы объясняется как результат низкой эффективной численности пула Y-хромосомы в популяции (в четыре раза меньше, чем для аутосом), а также существованием различных брачных систем у народов мира, например, многоженства или такого культурного феномена, когда вдовы вновь выходят замуж за брата умершего мужа и, наконец, различным поведением женщин и мужчин в военных походах, приводящим к эффекту бутылочного горлышка для мужчин.

Другая группа исследователей в своих работах использовала однонуклеотидные мутационные события для построения гаплотипов при изучении эволюции Y-хромосомы и определения географического характера их распространения [Mathias et al., 1994; Tayler-Smith et al., 1995]. Отметив девять таких событий, авторы показали, что большинство Y-гаплотипов являются специфическими для популяций, т.е. каждая популяция имеет только характерный для нее набор Y-гаплотипов [Jobling et al., 1995].

Наряду с диаллельными локусами, Y-специфические микросателлиты или короткие tandemные повторы (STR) также оказались полезным инструментом в руках исследователей эволюции человека. При очень низком уровне однонуклеотидного и минисателлитного полиморфизма Y-хромосомы микросателлиты показали уровень разнообразия, сходный с таковым для аутосомных микросателлитных локусов. Из-за высокой скорости мутирования эти маркеры не обнаруживают строгого неравновесия по сцеплению по сравнению с SNP, и характер аллельного разнообразия в них является результатом эволюционных событий, которые также характерны для аутосомных STR.

Популяционно-генетические особенности структурной вариабельности микросателлитных локусов Y-хромосомы на сегодняшний день изучены во многих популяциях мира, включая отдельные регионы Европы, Америки, Африки и Азии. С этой целью в качестве высокоинформативных маркеров эволюционной и генетической структуры популяций наиболее часто используется анализ поли-

морфизма числа простых тандемных повторов Y-хромосомы. Особого внимания заслуживает изучение микросателлитных гаплотипов на хромосомах, несущих определенные мутации. Анализ гаплотипического разнообразия на маркерных хромосомах дает возможность установить конкретный источник происхождения хромосомы-основателя и рассчитать приблизительное время ее появления в данной изучаемой популяции. Примером такого анализа является изучение гаплотипических вариантов на Y-хромосомах, несущих точковые мутации.

Несколько лет назад в локусе *RBF5* проксимального участка Y-хромосомы была идентифицирована новая точковая мутация — T → C транзигция (TAT-полиморфизм) [Tayler-Smith et al., 1993].

Анализ ее происхождения и распространения в некоторых странах мира проведен в 1997 г. [Zerjal et al., 1997]. Согласно этим авторам, Y-хромосомы с C-аллелем обнаружены с разной частотой среди населения Азии и Северной Европы, в то время как в Африке, Южной Европе, Южной Азии, Океании и Америке хромосомы с C-аллелем не встречались. Анализ микросателлитных гаплотипов на хромосомах с C-аллелем позволил предположить, что первоначально данная мутация возникла в странах Азии и затем распространилась на территорию Северной Европы вплоть до Финляндии. Это является подтверждением точки зрения о генетическом влиянии населения Азии на северо-европейские народы [Zerjal et al., 1997; Villems et al., 2002].

Предположения, что полиморфизм Y-хромосомы может оказаться чрезвычайно полезным в изучении древних миграций человека, были подтверждены рядом популяционно-генетических исследований.

Изучение полиморфизма Y-хромосомных маркеров у европейцев показывает их достаточно древнее происхождение. Одна из работ [Semino et al., 2000; Underhill et al., 2000] так и называется: «Генетическое наследие человека палеолита в ныне живущих европейцах: возможности Y-хромосомных маркеров». В этой работе принимал участие большой интернациональный коллектив, состоящий из двух американских и нескольких европейских лабораторий, включая одну из наших. Изучено более 1000 мужчин из 25 разных регионов Европы и Ближнего Востока. Анализ по 22 бинарным маркерам Y-хромосомы показал, что более 95% изученных образцов могут быть сведены к десяти гаплотипам, т.е. к 10 историческим родословным. Из них — два гаплотипа, обозначенные как Eu18 и Eu19 появились в Европе в палеолите. Более 50% всех изученных европейских мужчин относятся к этим древним гаплотипам, которые являются родственными и отличаются лишь одной точковой заменой (мутация M17), однако их географическое распределение имеет противоположную направленность. Частота Eu18 уменьшается с запада на восток, будучи наиболее выраженной у басков. Оценка возраста этого гаплотипа составляет примерно 30 тыс. лет, возможно, это самая древняя родословная в Европе. По типу географического распределения она очень напоминает распределение митохондриального гаплотипа V, также имеющего верхнепалеолитическое происхождение. Можно предположить, что гаплотип Eu18 Y-хромосомы и гаплотип V мтДНК являются характеристиками одной и той же древней европейской популяции, проживавшей в верхнем палеолите в районе Пиренейского п-ова.

Родственный Y-хромосомный гаплотип Eu19 имеет совсем другое распределение в европейских популяциях. Он отсутствует в Западной Европе, его частота

увеличивается к востоку и достигает максимума в Польше, Венгрии и на Украине, где предыдущий гаплотип Eu18 практически отсутствует. Самое высокое разнообразие микросателлитных маркеров в составе гаплотипа Eu19 найдено на Украине. Это позволило сделать предположение, что именно отсюда началась экспансия данной исторической родословной. К сожалению, среди вариантов мтДНК пока не найдено такого, который имел бы сходное с Eu19 географическое распределение.

Среди других Y-хромосомных гаплотипов большая часть имеет географическое распределение, указывающее на их происхождение из региона Ближнего Востока. Однако два из них — Eu7 и Eu8 — появились в Европе (или, возможно, здесь и возникли) также в палеолите. Характеристики этих исторических родословных очень напоминают таковые для гаплогруппы H митохондриальной ДНК. Возможно, что они маркируют одни и те же исторические события, связанные с расселением ближневосточных популяций в Европе в период, предшествующий последнему ледниковому максимуму.

Все остальные Y-хромосомные гаплотипы появились в Европе позже. В неолите произошла экспансия ряда гаплотипов из Ближневосточного региона, по мнению многих авторов, в связи с распространением земледельческой культуры.

Интересно, что в работе был выявлен новый вариант Y-хромосомы (мутация M178), встречающийся только в северо-восточных областях Европы. Возраст этого гаплотипа оценивается величиной, не превышающей 4000 лет, и его распространение может отражать сравнительно недавнюю миграцию уральских популяций.

Таким образом, в данной работе показано, что лишь немногим более 20% европейских мужчин относятся к историческим родословным (выявленным с помощью Y-хромосомного полиморфизма), которые появились в Европе сравнительно недавно — после ледникового периода в неолите. Около 80% мужчин Европы относятся к более древним европейским родословным линиям, нисходящим ко времени верхнего палеолита.

Интерес к популяциям Азии и Америки обусловлен, в первую очередь, проблемой заселения Американского континента человеком. Обширный объем данных получен при исследовании полиморфизма мтДНК, но остаются открытыми вопросы о времени и количестве миграций на континент. Заполнить пробелы в знаниях можно при изучении полиморфизма Y-хромосомы. В противоположность относительно высокому уровню изменчивости мтДНК результаты двух независимых исследований [Pena, 1995; Underhill, 1996] показали: во-первых, низкий уровень разнообразия Y-хромосомы; во-вторых, значительное преобладание определенного гаплотипа (более 90%) у коренных жителей Северной и Южной Америки. Такие результаты предполагают, что все коренные жители этого континента имели единого родоначальника [Pena, 1995; Santos, 1996], поскольку преобладающий гаплотип Y-хромосомы выявлен у представителей трех лингвистических групп. Это утверждение контрастирует с широко распространенной ранее точкой зрения, основанной на лингвистических доказательствах и поддержанной «классическими» генетическими маркерами, что существовали три отдельных волны заселения американского континента [Cavalli-Sforza et al., 1994].

На основании изучения полиморфизма мтДНК было сделано заключение о возможной миграции предковой популяции древних монголоидов из региона Юго-Западной Сибири [Сукерник, 1996] или территории Монголии через Бе-

рингийский перешеек, существовавший в палеолите, в Америку. Эта популяция и дала начало американским индейцам. Однако Монголия оказалась маловероятным источником происхождения предковой Y-хромосомы, так как преобладающий гаплотип аборигенов Америки отсутствует в популяциях Монголии [Pena et al., 1995]. Отсюда сделан вывод, что данный гаплотип произошел в предковой популяции уже на территории Америки (когда повысился уровень океана, отделив Новый Свет от Старого) и по этой причине отсутствует в популяциях Азии.

Интересные результаты были получены в работе, где описана транзиция C → T в локусе *DYS199* нерекombинирующей части Y-хромосомы. Наличие этой мутации, характерной только для коренного населения Америки, включая эскимосов и индейцев на-дене, позволило авторам предложить модель единого происхождения всех аборигенов Америки. Анализ сцепления между локусами *DYS19/DYS199* предполагает, что эта мутация произошла около 30 000 лет назад или в Северной Америке на ранних этапах заселения континента, или в предковой популяции, из которой произошли все аборигены Америки [Underhill et al., 1996; Thomson et al., 2000].

Изучение нескольких популяций Сибири определило наличие T-аллеля локуса *DYS199* только у азиатских эскимосов и родственных им племен в районе Берингии, что объясняется как результат или обратной миграции части предковой популяции с американского континента, или простого раскола популяции, населяющей Берингию, после ледникового периода [Santos et al., 1999]. Дополнительный анализ полиморфизма Y-хромосомы в популяциях Юго-Восточной Азии обнаружил общие корни американских индейцев и популяций центральных областей Сибири в районе Алтая [Santos et al., 1999]. Таким образом, *DYS199* оказался полезным маркером для идентификации предкового Y гаплотипа.

Используя другие полиморфные маркеры Y-хромосомы для построения гаплотипов, позднее обнаружили существование еще одного предкового гаплотипа для коренных американцев [Karafet et al., 1999].

Интенсивные изучения Alu-полиморфизма Y-хромосомы (YAP) сыграли значительную роль в популяционной и эволюционной генетике. Hammer [1994], основываясь на распределении частот YAP<sup>+</sup>-элемента в различных географических регионах, предположил африканское происхождение инсерции Alu-элемента в локусе *DYS287*. Высокая частота YAP<sup>+</sup> у негроидов и постепенное ее снижение в популяциях Северной Африки, Азии, Европы, Америки и Океании логично объяснялись этой гипотезой. Последующий анализ гаплотипов с использованием трех прилежащих к локусу *DYS287* однонуклеотидных полиморфных сайтов (PN1, PN2, PN3) и транзиции G → A в положении 4064 гена *SRY* [Hammer et al., 1995; Altheide et al., 1997] выявил высокую частоту некоторых YAP<sup>+</sup> гаплотипов в азиатской популяции и более высокий уровень варибельности микросателлитного локуса *DYS19* на «азиатских» YAP<sup>+</sup> хромосомах с гаплотипом 3 по сравнению с «африканскими» хромосомами, несущими этот же гаплотип. Эти данные, свидетельствующие о существенном азиатском вкладе в африканский пул Y-хромосом, позволили выдвинуть гипотезу об азиатском происхождении YAP<sup>+</sup>. И африканская и азиатская гипотезы требуют одинакового числа эволюционных событий для генерации и распространения YAP/SRY гаплотипов. Существенным слабым местом гипотезы азиатского происхождения Alu-инсерции в локусе *DYS287* является малая распространенность гаплотипов YAP<sup>+</sup> у населения современной Азии. Согласно теоретическим ожиданиям, предковые гаплотипы должны иметь

более широкий географический спектр распространения, чем производные от них гаплотипы, возникшие в результате более поздних мутаций [Templeton, 1993].

На территории Сибири высокая частота YAP<sup>+</sup> хромосом обнаружена в бурятской популяции, что свидетельствует, по мнению авторов [Степанов с соавт., 2000], в пользу североазиатского происхождения YAP-элемента у современных народов Азии. Скорее всего, популяции с высокой частотой Alu-элемента получили этот полиморфизм в результате независимых миграций из общего источника.

Детальная характеристика генофондов восьми этнических групп Северной Азии — тувинцев, бурят, алтайцев, хакасов, шорцев, сайотов, якутов и эвенков по данным об изменчивости мтДНК и Y-хромосомы позволили выявить географические закономерности в дифференциации населения, проявляющиеся в обособлении трех групп популяций, представленных этническими группами Центральной Азии, Средней Азии и Сибири. Более того, полученные данные свидетельствуют о гетерогенности генетического субстрата, на основе которого происходило формирование тюркоязычных народов Северной Азии.

При анализе полиморфизма диаллельных локусов Y-хромосомы в популяциях Волго-Уральского региона оказалось, что большинство выявленных у изученных народов гаплогрупп характерны для населения Западной Евразии. Наряду с этим, высокая доля специфичных для азиатских популяций гаплогрупп зарегистрирована у удмуртов. Сходные данные у удмуртов были получены по данным мтДНК. Полученные результаты продемонстрировали высокий уровень как внутри-, так и межпопуляционной дисперсии микросателлитных гаплотипов по мужской линии. По совокупности полученных данных сделано предположение об участии эффекта основателя по отцовской линии в этногенезе зауральских башкир.

О древних миграционных процессах в Европу может рассказать генетический анализ останков древнего человека. Раскопки в штате Вашингтон на американском континенте обнаружили скелет мужчины (*Kennewick man*), возраст которого датируется около 9000 лет, с характерными чертами европеоида. Для объяснения этого феномена авторы [Karafet et al., 1999] на основании изучения полиморфизма Y-хромосомы предлагают следующую версию: мужчины, проживающие в районе Юго-Западной Сибири/Центральной Азии, мигрировали в двух направлениях. Один пул, несущий Y-хромосомы с гаплотипом 1С, двинулся на северо-восток (предковая популяция аборигенов Америки), другая группа с этим же гаплотипом пошла в западном направлении в сторону Европы. Анализ SNP Y-хромосомы подтверждает эту гипотезу. Таким образом, обнаружение предковой линии Y-хромосомы для коренных американцев и европейцев в азиатских популяциях может объяснить наблюдаемое морфологическое сходство между европейцами и *Kennewick man*.

Результаты исследований популяции Эфиопии являются хорошим примером того, как изучение полиморфизма Y-хромосомы и мтДНК может дать различную, но дополняющую друг друга информацию, отражающую разную мужскую и женскую историю одной популяции. На основании данного исследования были сделаны выводы, что эфиопская популяция испытала европейское генетическое давление, главным образом, через мужчин, тогда как африканский генофонд этой популяции представлен благодаря женщинам.

Сравнительный анализ данных о полиморфизме мтДНК и Y-хромосомы позволил предположить, что для женской части населения планеты скорость мигра-



ций выше, чем для мужчин. Это связано с характером генетической изменчивости разных частей генома, передающихся по мужской и женской линиям [Stoneking, 1998; Wallac et al., 1999].

Этот вывод получил независимое подтверждение в работе исследователей [Perez-Lezaun et al., 1999], изучавших специфику миграций разных полов в популяциях Центральной Азии (киргизы, казахи, уйгуры) с помощью анализа мтДНК и микросателлитов Y-хромосомы. Высокую степень генетической дифференциации в этих популяциях для Y-хромосомы и, напротив, высокую гомогенность для мтДНК показали методом AMOVA (Analysis of Molecular Variants). При использовании микросателлитных маркеров Y-хромосомы был обнаружен эффект основателя для мужчин в популяции киргизов, проживающих в относительной изоляции в горных районах страны.

На основании вышеизложенного можно сделать вывод, что изучение Y-специфического полиморфизма увеличивает наше понимание исторических событий, миграционных процессов, филогенетических взаимоотношений различных народов. Конструирование Y-гаплотипов на основе комбинации уникальных диаллельных мутаций и микросателлитов является мощным инструментом для изучения эволюции и изменчивости современных популяций человека.

## Заключение

На основании первых исследований по этнической геномике, часть которых изложена в данной главе, складывается представление, что с помощью маркеров ДНК возможно получить большую информацию о генофонде по сравнению с маркерами прежних типов. Немалые надежды в этой связи возлагаются на использование ДНК-маркеров для выяснения временных параметров исторического развития этнических и региональных генофондов. Предпосылкой этому является все более уточняющиеся сведения о скорости мутационного процесса, происходящего в различных областях генома, включая гипервариабельные участки, являющиеся маркерами ДНК.

Нельзя не отметить новую возможность, которую этническая геномика предоставляет для популяционных исследований, — отдельно анализировать вклад в историю этноса женской линии (по маркерам мтДНК) и мужской линии (по маркерам Y-хромосомы). Изучение митохондриального генома древнего населения Восточной Европы дополняет палеоантропологические исследования и проливает свет на некоторые пути формирования генофонда. Можно надеяться, что со временем будут появляться другие возможности по мере все более подробного изучения конкретных маркеров ДНК.

В перспективе можно ожидать большее применение методов этногеномики в исследованиях, связанных с экологической генетикой, в частности, актуальным является сопоставление геногеографического распределения конкретных генов с факторами внешней среды.

Другой перспективой этногеномики можно считать ее дальнейшее развитие в направлении медицинской генетики, особенно в области изучения наследственной патологии и генетических факторов предрасположенности к таким распространенным болезням, как болезни сердца, диабет, гипертония, зависящим также от факторов внешней среды. Популяционная характеристика маркеров, сце-

пленных с генами предрасположенности, в сочетании с анализом параметров внешней среды позволит выявить новые важные закономерности, влияющие на здоровье человека.

## Литература

Баранов В.С., Иващенко Т.Э., Горбунова В.Н. и др. Аллельный полиморфизм ДНК-локусов *MET*, *D7S8*, *D7S23*, сцепленных с геном муковисцидоза, в некоторых популяциях СССР, в семьях высокого риска и у больных муковисцидозом // Генетика. 1991. Т. 27, № 1. С. 113–121.

Баранов П.О., Бабенко В.Н. и др. Особенности митохондриального генофонда российских немцев // Там же. 1999. Т. 35, № 2. С. 249–254.

Бермишева М., Тамбетс К., Виллемс Р., Хуснутдинова Э. Разнообразие гаплогрупп митохондриальной ДНК у народов Волго-Уральского региона // Мол. биол. 2002. № 6. С. 990–1001.

Галева А.Р., Сломинский П.А., Хуснутдинова Э.К., Лимборская С.А. Распространенность делеции 32 п.н. в гене рецептора хемокинов CCR5 в популяциях Волго-Уральского региона // Генетика. 1998. Т. 34, № 8. С. 1160–1162.

Котлярова С.Э., Краснова И.А., Коваленко С.П. Оценка частоты встречаемости аллелей гипервариабельного локуса *D17S30* в выборке населения европейского происхождения из ряда регионов Сибири // Там же. 1995. Т. 31, № 4. С. 573–577.

Лимборская С.А., Хуснутдинова Э.К., Балановская Е.В. Этногеномика и география народов Восточной Европы. М.: Наука, 2002. 261 с.

Мустафина О.Е., Туктарова И.А., Бикмеева А.М. и др. Исследование полиморфизма гена аполипопротеина Е в популяциях Волго-Уральского региона // Генетика. 2000. Т. 36, № 7. С. 980–985.

Петрищев В.Н., Кутуева А.Б., Рычков Ю.А. Делеционно-инсерционный полиморфизм в V-области мтДНК в десяти монголоидных популяциях Сибири. Частота делеции коррелирует с географическими координатами местности // Там же. 1993. Т. 29, № 7. С. 1196–1204.

Погода Т.В., Никонова А.Л., Колосова Т.В. и др. Аллельные варианты генов аполипопротеинов В и С2 у больных ишемической болезнью сердца и здоровых лиц из московской популяции // Там же. 1995. Т. 31, № 7. С. 1001–1009.

Рыков А.П. Мультилокусный ДНК-фингерпринтинг в генетико-популяционных исследованиях биоразнообразия // Мол. биол. 1999. Т. 33, № 6. С. 997–1011.

Рычков Ю.Г., Наумова О.Ю., Фалунин Д.А. Генофонд населения Северо-Восточной Евразии в свете данных о полиморфизме митохондриальной ДНК // Генетика. 1995. Т.31, №1. С.118–127.

Сломинский П.А., Попова С.Н., Шадрин М.И. и др. Нормальный полиморфизм повтора (СТG)<sub>n</sub> в гене миотонинпротеинкиназы (*DM*) на хромосоме 19q13.3 в популяциях Восточной Европы // Там же. 2000. Т. 36, № 7. С. 980–985.

Степанов В.А., Пузырев В.П. Гаплотипы двух диаллельных локусов Y-хромосомы у коренного и пришлого населения Сибири // Генетика. 2000. Т. 36, № 1. С. 87–92.

Сукерник Р.И. и др. Изменчивость мтДНК у коренных жителей Сибири в связи с реконструкцией эволюционной истории американских индейцев // Там же. 1996. Т. 32, № 3. С. 432–439.

*Хуснутдинова Э.К.* Молекулярная этногенетика народов Волго-Уральского региона. Уфа, Изд-во «Гилем». 1999. 237 с.

*Alteide T.K., Hammer M.F.* Evidence for a possible Asian origin of YAP+ Y chromosomes // *Am. J. Hum. Genet.* 1997. Vol. 61. P. 462–466.

*Bertanpetit J., Sala J., Calafell F.* Human mitochondrial DNA variation and the origin of the Basques // *Ann. Hum. Gen.* 1995. Vol. 59. P. 63–81.

*Cavalli-Sforza L.L.* The history and geography of human genes // Princeton University Press. Princeton. 1994. P. 274.

*Chen Y.S., Torroni A., Excoffier L.* et al. Analysis of mtDNA variation in African populations reveals the most ancient of all human continent-specific haplogroups // *Am. J. Hum. Genet.* 1995. Vol. 57. P. 133–149.

*Excoffier L., Poloni E.S., Santachiara-Benerecetti S.* et al. The molecular diversity of the Niokholo mandenralu from eastern Senegal: an insight into West Africa genetic history // In: Boyce A.J., Mascie-Taylor CGN (eds). *Molecular biology and human diversity.* Cambridge Univ. Press, Cambridge. 1996. P. 141–155.

*Hammer M.E.* A recent insertion of an Alu element on the Y chromosome is a useful marker of human population studies // *Mol. Biol. Evolution.* 1994. V. 11. P. 749–761.

*Hammer M.F.* A recent common ancestry for human Y chromosomes // *Nature.* 1995. Vol. 378. P. 376–378.

*Horai S., Hayasaka K., Kondo R.* et al. Recent African origin of modern humans revealed by complete sequences of hominoid mitochondrial DNAs // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995. Vol. 92. P. 532–536.

*Jeffreys A.J., Royle N.J., Patel I.* et al. Principles and recent advances in human DNA fingerprinting // *DNA Fingerprinting: Approaches and applications.* Birkhauser Verlag. Basel. Boston. Berlin. 1991. P. 1–20.

*Jobling M.A., Williams G., Schievel K.* et al. A selective difference between human Y-chromosomal DNA haplotypes // *Curr. Biol.* 1998. Vol. 8. P. 1391–1394.

*Jorde L.B., Watkins W.S., Bamshad M.J.* et al. The distribution of human genetic diversity: a comparison of mitochondrial, autosomal, and Y-chromosome data // *Am. J. Hum. Genet.* 2000. Vol. 66. P. 979–988.

*Kalnín V.V., Kalnina O.V., Prosnýak M.I.* et al. Use of DNA fingerprints for human population genetic studies // *Mol. Genet.* 1995. Vol. 247. P. 488–493.

*Karafet T., Zegura S., Posukh O.* et al. Ancestral Asian Source(s) of New World Y-Chromosome Founder Haplotypes // *Am. J. Hum. Genet.* 1999. Vol. 64. P. 817–831.

*Kayser M., Krawczak M., Excoffier L.* et al. An Extensive Analysis of Y-Chromosomal Microsatellite Haplotypes in Global Dispersed Human Populations // *Ibid.* 2001. Vol. 68. P. 990–1018.

*Kayser M., Roewer L., Heldman M.* et al., Characteristics and frequency of germline mutations at microsatellite loci from the human Y chromosome, as revealed by direct observation in father/son pairs // *Ibid.* 2000. Vol. 66. P. 1580–1588.

*Krings M., Stone A., Schmitz R.W.* et al. Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans // *Cell.* 1997. Vol. 90. P. 19–30.

*Lahermo P., Sajantila A., Sistonen P.* et al. The genetic relationship between the Finns and the Finnish Saami (Lapps): analysis of nuclear DNA and mtDNA // *Ibid.* 1996. Vol. 58. P. 1309–1322.

*Limborska S., Balanovsky O., Balanovskaya E.* et al. Analysis of CCR5.32 geograph-

ic distribution and its correlation with some climatic and geographic factors // *Human Heredity*. 2002. № 53. P. 49–54.

*Macauley V., Richards M., Hickey E.* et al. The emerging tree of West Eurasian mtDNA: A synthesis of control-region sequences and RFLPs // *Am. J. Hum. Genet.* 1999. Vol. 58. P. 1309–1322.

*Mathias N., Bayes M., Tyler-Smith C.* Highly informative compound haplotypes for the human Y-chromosome // *Hum. Mol. Genet.* 1994. Vol. 3. P. 115–123.

*Pena S.D.Y., Santos E.R., Bianchi N.O.* et al. A major founder Y chromosome haplotype in Amerindians // *Nature Genet.* 1995. Vol. 11. P. 15–16.

*Perez-Lezaun A., Calafell E., Comas D.* et al. Sex-specific migration patterns in Central Asian populations, Revealed by Analysis of Y-chromosomal short tandem repeats and mtDNA // *Am. J. Hum. Genet.* 1999. Vol. 65. P. 208–219.

*Richards M., Corte-Real H.* et al. Paleolithic and neolithic lineages in the European mitochondrial gene pool // *Ibid.* 1996. Vol. 59. P. 185–203.

*Sajantila A., Lukka M., Syvanen A.C.* Experimentally observed germline mutations at human micro- and minisatellite loci // *Eur. J. Hum. Genet.* 1999. Vol. 7. №2 P.263–266.

*Santos F., Pandya A.* et al. The Central Siberian Origin for Native American Y Chromosomes // *Am. J. Hum. Genet.* 1999. Vol. 64. P. 619–628.

*Santos F., Rodriguez-Delfin L.* et al. North and South Amerindians may have the same major founder Y chromosome haplotype // *Ibid.* 1996. Vol. 58. P. 1369–1370.

*Semino, G. Passarino* et al. Homo sapiens in Extant Europeans: A Y chromosome perspective // *Science*. 2000. Vol. 290. P. 1155–1159.

*Stonnecking M.* Women on the move. // *Nat. Gen.* 1998. Vol. 20. P. 219–220.

*Sykes B.* The molecular genetic of European ancestry // *Philos. Trans. R. Soc. Long B. Biol. Sci.* 1999. Vol. 354. P. 131–138.

*Sykes B., Leiboff A., Low-Beer J.* et al. The origins of the polynesians: an interpretation from mitochondrial lineage analysis // *Am. J. Hum. Genet.* 1995. Vol. 57. P. 1463–1475.

*Taylor-Smith C., Hammer M.* The relationships of Y chromosomes determined using five RFLPs and the YAP element // *Y chromosome newsletter*. 1995. Vol. 2. P. 4–5.

*Taylor-Smith C., Oakey R.J., Lazin Z.* et al. Localization of DNA sequences required for human centromere function through an analysis of rearranged Y chromosomes // *Nat. Genet.* 1993. Vol. 5. P. 368–375.

*Templeton A.R.* The "Eve" hypothesis: a genetic critique and reanalysis // *Am. Antropol.* 1993. Vol. 95. P. 51–72.

*Thomson R., Pritchard J., Shen P.* et al. Recent common ancestry of human Y chromosomes: Evidence from DNA sequence data // *PNAS*. 2000. Vol. 97. № 13. P. 7360–7365.

*Tishkoff S.A., Dietzsch E., Speed W.* et al. Global patterns of linkage disequilibrium at the CD4 locus and modern human origins // *Science*. 1996. Vol. 271. P. 1380–1387.

*Torrioni A., Huoponen K.* et al. Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations // *Genetics*. 1996. Vol. 144. P. 1835–1850.

*Torrioni A., Petrozzi M., D'Urbano L.* et al. Haplotype and phylogenetic analysis suggest that one European-specific mtDNA background plays a role in the expression of Leber hereditary optic neuropathy by increasing the penetrance of the primary mutations 11778 and 14484 // *Am. J. Hum. Genet.* 1997. Vol. 60. № 5. P. 1107–1121.

*Torrioni A., Petrozzi M., Santolamazza P.* et al. About the Asian-specific 9-bp deletion of mtDNA // *Ibid.* 1995. Vol. 57. P. 07–508.

*Underhill P., Li J., Zemans R., Cavalli-Sforza L.* A pre-Columbian Y chromosome-specific transition and its implications for human evolutionary history // *Genetics*. 1996. Vol. 93. P. 196–200.

*Underhill P.A., Jin L., Lin A.A.* et al. Detection of numerous Y chromosome biallelic polymorphisms by denaturing high-performance liquid chromatography // *Genome Res.* 1997. Vol. 7. № 10. P. 996–1005.

*Underhill P.A., Shen P., Lin A.A.* et al. Y chromosome sequence variation and the history of human populations // *Nat. Genet.* 2000. Vol. 26. P. 358–361.

*Villems R., Rootsi S., Khusnutdinova E.* et al. Archaeogenetics of Finno-Ugric speaking populations // *The Roots of Peoples and Languages of Northern Eurasia. IV.* /Ed. by K.Julku. Oulu. 2002. P. 271–284.

*Wallace D.C., Brown M.D., Lott M.T.* Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease // *Gene*. 1999. Vol. 238. P. 211–230.

*Ward R.H., Valencia D.* Phylogeographic variability in traditional societies // *Ciba Found Symp.* 1996. Vol. 197. P. 6–19. Discussion: P. 19–24.

*Watson E., Forster P., Richards M., Bandelt H.J.* Mitochondrial footprints of human expansions in Africa // *Am. J. Hum. Genet.* 1997. Vol. 61, № 3. P. 691–704.

*Zerjal T., Dashnyam B.* et al. Genetic relationships of Asians and Northern Europeans, revealed by Y-chromosomal DNA analysis // *Ibid.* 1997. Vol. 60. P. 1174–1183.

*Zhivotovsky L.A.* A new genetic distance with application to constrained variation at microsatellite loci // *Mol. Biol. Evol.* 1999. Vol. 16, № 4. P. 467–471.

*Zhivotovsky L.A.* Estimating divergence time with use of microsatellite genetic distances: impacts of population growth and gene flow // *Ibid.* 2001. Vol. 18. P. 700–709.

*Zhivotovsky L.A.* Human Population Expansion and Microsatellite Variation // *Mol. Biol. Evol.* 2000. Vol. 17. № 5. P. 757–767.

# Геномика и этика

*В.И. Иванов, В.Л. Ижевская*

Появление новых данных о тонком строении генома человека, полученных в рамках одноименной международной программы, позволило провести целый ряд оригинальных прикладных разработок, ориентированных на основные задачи медицины — диагностику, лечение и профилактику заболеваний человека.

Всего четверть века тому назад самыми тонкими методами изучения наследственной патологии человека были цитогенетический анализ хромосом и биохимическое исследование метаболитов и ферментов клеток.

Со второй половины 1980-х гг., и особенно в связи с разработкой международного проекта «Геном человека», ситуация радикально изменилась: причины, патогенез и клинические проявления разных форм патологии стали доступными для изучения и воздействия на них с помощью геномных и молекулярно-генетических технологий.

Тонкие методы выделения, генетического и физического картирования, клонирования, секвенирования, гибридизации ДНК уже вошли в лабораторную и клиническую практику диагностики заболеваний человека во всех развитых странах мира и Европы, включая Россию. При этом прогрессивно возрастает значение геномных технологий в диагностике **ненаследственной** патологии. Комплексное исследование структуры и функции генома выделилось в самостоятельную дисциплину, получившую название «*геномика*».

Разработанные на базе технологии рекомбинантных ДНК методы конструирования векторов для переноса в клетки-мишени, интеграции в геном реципиента и экспрессии в нем корригирующих ДНК-последовательностей начинают применяться для молекулярной заместительной терапии генетических и иных дефектов. С помощью методов молекулярной биологии стало возможным расщеплять хромосомную ДНК человека, имеющую суммарную протяженность свыше трех млрд пар нуклеотидов, на относительно короткие участки, доступные для прочтения, что позволяет выявлять и картировать на хромосомах избыточные, недостающие или измененные последовательности ДНК, иными словами, по образному выражению профессора В. Мак-Кьюсика, строить «*молекулярную патологическую анатомию генома человека*».

К настоящему времени уже выявлено, картировано и изучено несколько сот патологически измененных последовательностей ДНК, обуславливающих развитие заболеваний. Практически это означает возможность точного диагноза и прогноза различных заболеваний, поскольку изменения в геноме присутствуют и передаются от клетки к клетке не только во время уже разыгравшейся болезни, а постоянно во всех клетках тела, имеющих хромосомы, в том числе в клетках тела зародыща с самого начала его внутриутробного развития.

Все большее проникновение биотехнологий в медицинскую практику привело к вычленению из общей и медицинской этики специального раздела — биоэтики, разработка проблем которой имеет уже 20-летнюю международную историю.

Если сформулировать просто, то *этика — это правила взаимоотношения людей, способствующие возрастанию дружелюбия и снижению агрессивности*. К этому, собственно, сводится вся суть этических принципов, независимо от того, говорим ли мы о межличностных отношениях или об отношениях групп людей. Можно считать, что этические нормы соблюдаются, если, различая, «что такое хорошо, а что такое плохо», люди стараются делать так, чтобы хорошего было побольше, а плохого — поменьше.

Совокупность этических норм поведения человека складывается из трех компонентов: *врожденной, доктринальной и конвенциональной* этики. Врожденная этика в какой-то мере имеется и у животных. Ее иногда еще называют зоологической этикой, потому что элементы регламентации правил поведения животных один относительно другого в группах, прайдах, стадах, стаях реально существуют и устанавливаются как инстинктивное поведение, которому не обучаются, с которым появляются на свет.

У человека, в отличие от животных, есть еще доктринальная этика, которая базируется на тех или иных идеологических доктринах. Прежде всего это — религиозная этика, присутствующая во всех обществах, начиная с самых древних.

Наконец, существует этика конвенциональная, которая устанавливается по взаимной договоренности людей или человеческих общностей: как им вести себя по отношению друг к другу. Эта этика была в свое время обозначена Жаном-Жаком Руссо в трактате «Общественный договор».

Из общей этики в настоящее время вычленилась биоэтика как очередная ступень развития этики в эру высоких биомедицинских технологий, сильно инвазивных по отношению к человеку, и не только к его соматическому статусу, но и к его интеллектуальной и эмоциональной сфере. Появилась и биоэтика поведения людей по отношению друг к другу в условиях приложения одним человеком к другому/другим индивидам (или одной группой людей по отношению к другой группе людей) таких технологий, которые могут изменить его сом, психику и даже потомство.

Ввиду того, что мир населен многими народами с разными религиозными и другими идеологическими воззрениями, нормы биоэтики варьируют. Так, в одном международном обследовании по биоэтике, которое было организовано Национальным институтом здоровья США, с участием исследователей из 39 стран, в том числе и нашей группы из России, выявилось, что существуют некоторые частные этические понятия, которые разделяются одной общностью людей, одной нацией, или одним этносом, или адептами определенных религиозных воззрений, с другой стороны, есть этика региональная, наднациональная и есть некоторые этические элементы глобальной значимости. Все эти аспекты являются в настоящее время предметом широкого обсуждения.

В глобальной биоэтике выделяются некоторые ключевые понятия или постулаты, которые затем дальше разрабатываются и конкретизируются, образуя некоторый общий биоэтический кодекс.

Общепринято выделять в качестве центральных постулатов следующие положения:

1. Признание автономии личности (*personal autonomy*), т.е. право человека самому решать за себя все вопросы, которые касаются его/ее сомы, психики, эмоционального статуса.

2. Справедливость (*justice*), которая подразумевает равный доступ всех людей к необходимым общественным благам. Это касается и медицины, и здравоохранения, и технологий, если это создается на коллективные средства общества, т.е. справедливость — это право налогоплательщика на равную или уравнивленную долю необходимых для нормальной жизни средств из общественных фондов.

3. Гиппократовское «не вреди», означающее, что этично применять к какому-либо лицу только те воздействия, которые не причинят ему вреда.

4. В современной биоэтике гиппократовское «не вреди» расширяется до: «не только не вреди, но и сотвори благо». Первое обозначается как *non-maleficence* (непричинение вреда), второе — *beneficence* (благодеяние).

Эти четыре принципа оказываются центральными на всех уровнях биоэтики и во всех ее разделах и аспектах.

Почему генетика человека оказывается связанной с этическими проблемами? Во-первых, потому, что в любом генетическом исследовании или медико-генетической программе *прямо* участвуют много сторон: исследователь, врач, испытуемый, донор, реципиент, пациент, члены семьи. Во-вторых, *косвенно* принимают участие и некоторые социальные службы (по трудоустройству, страхованию жизни, здоровья, имущества и пр.), с помощью которых люди вступают в отношения друг с другом в связи с проведением генетических исследований или приложением их результатов в практической жизни. При этом люди могут по-разному работать с образцами биоматериала: брать их, изучать, технологически трансформировать, передавать их другим людям (исследователям, или врачам, или кому-то еще), вводить в организм реципиента образцы, содержащие генетическую информацию. Причем информацию они тоже могут использовать по-всякому: хранить, передавать, распространять, уничтожать. И все это — информация генетическая, к которой причастны и те люди, которые являются испытуемыми, пациентами, членами их семей и т.д. При этом, у этики генетики есть одно отличие от многих других разделов биомедицинской этики: не только сам испытуемый, но и его прямые потомки в нескольких поколениях могут оказаться объектами воздействия измененной генетической информации.

В медицинской генетике обязательными элементами являются *медико-генетическое консультирование* и *тестирование*, под которым понимается испытание субъекта на определенные особенности его генетической системы. Когда же обследуются популяции или какие-либо контингенты людей на наличие каких-то генетических особенностей и частоту их распространения, это чаще обозначается как *скрининг* — просеивание популяции на определенный/определенные признак/признаки. Наконец, генетика человека может быть связана с попытками лечения болезней, в том числе с использованием генотерапии. Все такие процедуры связаны с взаимодействием людей и, значит, нуждаются в этической регламентации. Об этом особенно остро идет речь в странах, где хорошо отлажены организационные и юридические системы.

Все виды процедур должны осуществляться с информированного согласия субъекта, который вступает в контакт с генетиком, врачом, или иным исследователем **добровольно**, при этом профессионал обязан обеспечить его в доступной



форме тем, что называется в английском языке *appropriate information* — адекватной информацией, необходимой, достаточной и понятной, и которая помогла бы автономной личности (субъекту) принимать самостоятельное решение о том, на что (на какие процедуры) она (личность) согласна пойти, а на что — не согласна. При этом приоритеты в этическом решении генетических процедур идут по убывающей: индивид с правами личности, правами человека, записанными в Декларации прав человека (ООН, 1948), потом семья и кровные родственники, а затем — общество. Прежние обратные пирамиды «общество—семья—индивид» в глобальной биоэтике не принимаются. При этом врач или исследователь, общаясь с пациентом или испытуемым, должны избегать насколько это возможно директивности.

Следует обратить внимание еще на одно неизменное правило, которое вытекает из принципов «автономии личности», «не вреди» и «сотвори благо», — *правила конфиденциальности информации*. Это правило проходит через все документы по биоэтической регламентации медицинской деятельности. Согласно этому правилу, информация о генетическом статусе человека может быть сообщена только ему, его опекунам или иным официальным представителям и пользующим его врачам. Передача профессионалом третьей стороне (органам образования, трудоустройства, страхования, социальным службам и т.д.) какой-либо информации недопустима без санкции тестируемого или его законных опекунов, так как это может повлечь за собой дискриминацию такого лица на основании сведений о его генетическом статусе, что равносильно своего рода «генетическому шовинизму».

Этические принципы медицинской генетики сформулированы в рекомендациях Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ): *Proposed International Guidelines on Ethical Issues in Medical Genetics and Genetic Services* (Женева, 15–16 декабря 1997 г.). В этом руководстве изложены как общие этические принципы деятельности генетической службы, так и частные — применительно к отдельным направлениям медицинской генетики: генетическому консультированию, генетическому скринингу, пресимптоматическому тестированию и тестированию на предрасположенность к заболеваниям, пренатальной диагностике, работе банков ДНК и др.

По рекомендации ВОЗ генетическая служба в своей деятельности должна придерживаться следующих этических принципов:

- справедливое распределение общественных ресурсов для профилактики наследственных заболеваний и врожденных пороков развития на основе необходимости, определенной по тяжести и важности проблем, и пользы от принимаемых действий;
- уважение генетических и культурных различий людей;
- уважение человеческого интеллекта и лиц, чья точка зрения находится в меньшинстве;
- обучение генетике всех членов общества, работников здравоохранения, учителей, религиозных деятелей и др.;
- участие общественности в обсуждении целей генетической службы, ее средств и методов;
- добровольный подход к генетическому тестированию, профилактике и лечению заболеваний; исключение всех видов принуждения со стороны государства, общественности или врачей;

- обеспечение пациентов необходимым медицинским наблюдением и лечением; отказ от проведения тестов или процедур не по медицинским показаниям; постоянный контроль качества службы;
- свобода выбора во всех вопросах, касающихся генетики; женщина должна быть главным лицом при принятии решения в сфере воспроизводства;
- предупреждение дискриминации или стигматизации на основе генетической конституции;
- все генетические тесты должны быть добровольными и проводиться на основе информированного согласия. Особые усилия по соблюдению прав человека должны быть предприняты при тестировании здоровых людей на предрасположенность к генетическим или мультифакториальным заболеваниям с поздним возрастом начала, не имеющим эффективных методов профилактики и лечения. Доклиническое тестирование детей должно проводиться только в интересах ребенка, если очевидна медицинская или психологическая польза от такого тестирования;
- пренатальная диагностика должна проводиться только для получения семьей или врачами информации о здоровье плода. Ее использование для проведения любой социальной политики или для немедицинских целей, таких как тестирование отцовства или селекция по полу, за исключением сцепленных с полом заболеваний, этически неприемлемо;
- пренатальная диагностика по медицинским показаниям должна быть добровольной и доступной в объеме, зависящем от возможностей каждой страны, независимо от взглядов супружеской пары на аборт. Только будущие родители могут решить, является ли заболевание плода, выявленное при дородовом обследовании, основанием для прерывания беременности, или информация о болезни плода будет использована ими для подготовки к рождению больного ребенка;
- выбор женщины или супружеской пары относительно сохранения или прерывания беременности больным плодом должен быть принят и защищен. Только супруги, а не медики, имеют право на выбор решения.

Недостаток и неравномерное распределение общественных ресурсов приводят к возникновению серьезной этической проблемы о месте генетической службы в системе здравоохранения и о доступности современных достижений генетики для населения. Низкий уровень образованности населения и врачей общей практики в сочетании с традиционным «медицинским патернализмом» приводит к нарушениям принципов недирективности генетического консультирования и уважения автономии личности. В ряде стран культурные традиции могут противоречить современным взглядам на применение геномных технологий. Тем не менее, несмотря на культурные, религиозные, социальные, экономические различия между странами существуют общие этические принципы деятельности генетической службы, применимые и для развитых, и для развивающихся стран.

Принципы доступности медико-генетической помощи, автономии личности, недирективного консультирования, информированного согласия на все виды обследований и процедур и информированного выбора, уважения конфиденциальности и целостности индивида приняты в большинстве стран.

Значительные различия в суждениях медиков, пациентов, общества в разных культурах наблюдаются в вопросе о прерывании беременности, в том числе бере-

менности неизлечимо больным плодом. Представители одной крайней точки зрения считают, что искусственное прерывание беременности (даже на основании безнадежного прогноза для плода) недопустимо. Представители другой крайней точки зрения считают, что в безнадежной ситуации не следует возлагать на женщину, ее семью, общество моральное и материальное бремя по содержанию до естественной кончины неизлечимо пораженного индивида.

В медико-генетической практике это отчасти связано с тем, что проявление наследственных, в том числе патологических признаков подвержено широкой вариации, которую обнаруживают как само проявление или непроявление генотипа, так и время, и степень манифестации. Поэтому, даже обнаружив определенное изменение в геноме, часто нельзя дать однозначный прогноз о его влиянии на здоровье человека, а, следовательно, нельзя и предложить однозначную этически приемлемую рекомендацию, скажем о сохранении и лечении пораженного плода.

Невозможность точного прогнозирования тяжести течения заболевания в постнатальном периоде при наличии мутационного повреждения генов в клетках плода можно проиллюстрировать на примере митохондриальных заболеваний. Возникновение этих болезней обусловлено мутациями в митохондриальном геноме, который организм получает с материнской гаметой. Характерной особенностью этого типа наследования является эффект гетероплазмии — различного соотношения мутантной и нормальной мтДНК в отдельных клеточных клонах. Для возникновения клинических признаков необходимо наличие определенного порогового уровня мутантной ДНК митохондрий, специфичного для различных органов человека. Определение количества клеток, имеющих мутацию в митохондриальном геноме при проведении родовой диагностики в настоящее время вызывает значительные трудности, в связи с чем международным сообществом генетиков принято решение не проводить родовую диагностику митохондриальных заболеваний в отягощенных семьях.

Ряд этических проблем возникает при проведении генетического скрининга и досимптоматического тестирования мутаций при наследственных болезнях с поздним возрастом начала заболевания, таких как хорья Гентингтона. Эти проблемы связаны как с возможной дискриминацией лиц, имеющих положительные результаты тестов, так и с возможным влиянием положительных результатов досимптоматического тестирования на психическое благополучие людей, здоровых на момент тестирования. Эти аспекты генетического скрининга и тестирования нашли отражение в документах ВОЗ и Совета Европы.

В соответствии с общепринятыми международными нормами генетический скрининг и досимптоматическое тестирование взрослых должны быть добровольными, причем их участники должны быть свободны в выборе (на основе исчерпывающей информации), подвергнуться тестированию или нет, в соответствии со своими взглядами и моральными принципами. Скрининг детей для ранней диагностики и своевременного лечения в интересах их здоровья должен быть обязательным и бесплатным (например, скрининг новорожденных на фенилкетонурию). Обязательным условием такого скрининга является доступность своевременного и адекватного лечения заболевания.

При проведении генетического скрининга и досимптоматического тестирования участники должны получить исчерпывающую информацию о целях, воз-

можных результатах обследования и возможном выборе. Выявленные в результате скрининга больные, их родители (или носители гена наследственного заболевания с поздним возрастом начала) должны получить генетическую консультацию для всесторонней информации о заболевании, его значении для индивида и членов его семьи, методах лечения и социальной поддержки, а также адекватную психологическую поддержку.

Во многих странах законодательно запрещено проведение генетического скрининга заболеваний, для которых в настоящее время невозможно лечение. Тем не менее, ВОЗ допускается осуществление досимптоматического тестирования взрослых при отсутствии методов лечения заболевания при соблюдении следующих условий: полученная информация необходима для предотвращения ущерба здоровью родственников (например, будущих детей); лицо, подвергающееся тестированию, полностью информировано об ограничениях теста (о возможности неинформативного результата или невозможности точно предсказать возраст начала заболевания и пр.) и способно адекватно воспринять эту информацию, а также при наличии долговременной консультативной программы по данному заболеванию.

Однако ряд экспертов считают, что необходимы длительные исследования для оценки жизненных ожиданий и качества жизни после досимптоматического тестирования для улучшения психологических и социальных последствий такого обследования. В последние годы показано, что люди, имеющие риск развития наследственного заболевания с поздним возрастом начала, не всегда обращаются к генетикам для проведения досимптоматического тестирования. Так, в Великобритании только 10% людей, у которых один из родителей был болен хореей Гентингтона, обратились к врачу-генетику и только 2/3 из них согласились пройти ДНК-тестирование.

Досимптоматическое тестирование детей на заболевания с поздним началом (или тестирование на предрасположенность к заболеваниям) при отсутствии методов лечения или профилактики, по мнению большинства исследователей и биоэтических комитетов, следует отложить до достижения возраста, когда молодой человек сможет принять собственное решение по этому вопросу.

Важным аспектом медико-генетического консультирования при проведении тестирования на доклинической стадии заболевания является оказание психологической поддержки консультирующимся при обнаружении у них носительства патологического гена.

Основное назначение генетической информации, полученной в результате генетического тестирования, является ее влияние на репродуктивный выбор семьи. При использовании такой информации может возникнуть опасность проведения евгенических процедур. Большинство международных и национальных биоэтических комитетов считают, что наилучшей защитой прав человека в таких случаях является свободно данное согласие на проведение медицинских процедур на основе полной и непредвзятой информации.

Особые проблемы возникают при попытках применения генетических технологий для решения немедицинских задач, таких как выбор пола плода по желанию родителей, тестирование плода для возможного донорства тканей, дородовое определение отцовства (кроме случаев изнасилования или предполагаемого инцеста). Существующими международными документами проведение таких процедур запрещается.

Этические проблемы требуют взвешенного подхода и при этиологическом лечении наследственных и врожденных болезней с помощью генотерапии, т.е. путем искусственного генно-инженерного замещения поврежденных генетических структур нормальными донорскими или синтезированными в лаборатории *in vitro*. Такие методики генотерапии можно назвать своего рода «молекулярным протезированием». Это направление уверенно набирает силу уже не только в лабораториях, но и в клиниках. Тем более что ведущей тенденцией развития новых генетических технологий является все большая миниатюризация процедур генодиагностики и генотерапии и сдвиг времени их выполнения на все более ранние сроки беременности, а то и на предшествующий период отдельного развития мужских и женских зародышевых клеток в организмах супругов (так называемые прекоцепционные процедуры).

Несмотря на то, что все процедуры генотерапии строго подчиняются общепринятым правилам безопасности при проведении генно-инженерных работ, введение генных конструкций в организм человека предъявляет к вопросам генетической безопасности повышенные требования. Особое значение имеет тип клеток, служащих объектом генотерапии. Любое введение в клетки человека генетического материала может иметь отрицательные последствия, связанные с неконтролируемым встраиванием их в те или иные участки генома, что может привести к нарушению функции генов. Однако отрицательные последствия генотерапии соматических и половых клеток несоизмеримы по своему масштабу. В первом случае речь идет о судьбе одного тяжело больного индивида, и риск, вызываемый лечебными процедурами, обычно ниже, чем риск смертельного исхода от первичного заболевания. Кроме того, степень генетического риска при генотерапии соматических клеток снижается при использовании генетических конструкций, не способных к встраиванию в геном клетки-реципиента. В то же время при внесении генетических конструкций в половые клетки возникает возможность внесения нежелательных изменений в геном будущих поколений. В международных документах ВОЗ, ЮНЕСКО, Совета Европы признается этически допустимой только генотерапия соматических клеток.

Успехи в изучении генома человека делают реальным в настоящее время или в ближайшем будущем тестирование на предрасположенность к распространенным заболеваниям, таким как сердечно-сосудистые, онкологические заболевания и др. И если в решении этических проблем, возникающих при ДНК-тестировании с целью диагностики моногенных заболеваний, в основном, достигнут консенсус, то этические проблемы, возникающие при тестировании на носительство генов предрасположенности к распространенным заболеваниям, широко обсуждаются во всем мире. В первую очередь это связано с тем, что генетическая информация, полученная в результате такого тестирования, носит вероятностный характер. Ситуацию осложняет то обстоятельство, что в развитии распространенных заболеваний играют роль не один, а несколько генов предрасположенности, причем каждый из них дает относительно небольшой вклад в развитие заболевания, кроме того значителен вклад факторов внешней среды в процесс развития заболевания.

Несомненно, знания о вкладе конкретных генов в предрасположенность к определенным заболеваниям важны, особенно, если проведение профилактических мероприятий в группе предрасположенных к заболеванию лиц позволяет

существенно снизить риск его развития или тяжесть течения. Однако существует опасность вызвать серьезные психологические проблемы у этих лиц.

Основное назначение медико-генетического консультирования и генетического тестирования при мультифакториальных заболеваниях — расчет индивидуального риска развития заболевания и определение индивидуальных мер для его предупреждения у лиц с высоким риском. При этом основные ограничения в применении имеющихся тестов в настоящее время связаны с недостаточностью наших знаний о числе вовлеченных в процесс генов, о том как они комбинируются, взаимодействуют между собой и какую роль играют в их проявлении факторы внешней среды. Дальнейшее изучение генов предрасположенности имеет несомненное научное значение, однако большинство исследователей склоняются к мысли, что пока эти тесты не дают достаточно информации для практической медицины. При проведении таких исследований врач или исследователь обязан объяснить пациенту ограниченность современных научных знаний.

В то же время значительная коммерциализация работ в области геномики привела к тому, что большое число наборов для генетических тестов на предрасположенность к распространенным заболеваниям будет предлагаться фирмами-изготовителями непосредственно населению. Это может привести к тому, что такое тестирование будет проводиться чаще, чем это необходимо для общества и здравоохранения.

ВОЗ рекомендует проводить такое тестирование, только если его результаты могут быть эффективно использованы для профилактики и лечения заболевания, при условии полной информированности пациента и его добровольного согласия.

Широкое распространение генетических тестов может привести к дискриминации отдельных лиц на основании генетической информации о них, если она становится доступной для третьих лиц.

Для того чтобы избежать дискриминации, к результатам всех видов генетического тестирования не должны иметь доступ работодатели, страховые компании и другие третьи лица. В ряде стран принят мораторий на использование генетической информации при страховании, трудоустройстве и пр. Однако подобная информация уже используется «третьими сторонами» в ряде ситуаций. Например, этическим комитетом Великобритании признано, что генетический скрининг на повышенный профессиональный риск может проводиться при следующих условиях:

1. Имеются несомненные доказательства связи рабочей среды с развитием заболевания, на которое проводится тестирование.
2. Заболевание, на которое проводится тестирование, опасно для работника, или если больной работник представляет серьезную опасность для третьих сторон.
3. Заболевание нельзя предотвратить при профилактических изменениях рабочей среды.

Широкое клиническое применение генодиагностики и генетического скрининга привело к накоплению образцов в банках ДНК. Использование этих образцов для исследовательских и диагностических целей требует регламентации. Руководство по решению возникающих проблем предложено этическим комитетом HUGO (Human Genome Organization), ВОЗ и др. Поскольку информация о ДНК важна не только для самого индивида, но и для его родственников, то в первую очередь обсуждается вопрос, для кого должны быть доступны хранящиеся

образцы. Моральным долгом каждого человека является предотвращение вреда здоровью его живущим или будущим родственникам. Поэтому образцы ДНК должны быть доступны для кровных родственников донора ДНК (даже если они не финансировали ее хранение) для того, чтобы они могли узнать свой собственный генетический статус (но не статус донора). Супруг донора может быть проинформирован о факте помещения ДНК в банк, но не должен получать информацию о ней без согласия донора. Работодатели, страхователи, работники образования и другие третьи стороны не должны иметь доступ к хранящейся информации. При проведении научных исследований образцы могут быть предоставлены для этого банком ДНК при условии согласия донора на участие в исследовательских проектах и исключении возможности его идентификации путем предоставления кодированных или анонимизированных образцов. В последнем случае следует учитывать невозможность использования полезных для данного донора результатов научного исследования для пользы его здоровья или во благо членов его семьи.

Для регламентации работы банков ДНК представляется наиболее эффективным и экономичным получение письменного информированного согласия донора ДНК на предоставление его образца для научных исследований при соблюдении конфиденциальности. Согласие может также включать разрешение на предоставление образца родственникам или супругам.

Этические проблемы исследования генома человека и практического использования геномных технологий содержат ряд общечеловеческих аспектов, разрабатываемых Программой по генетике человека ВОЗ, Международными комитетами по биоэтике при Совете Европы, ЮНЕСКО и др.

На 29-ой сессии Генеральной конференции ЮНЕСКО 11 ноября 1997 г. была единогласно принята «Всеобщая декларация о геноме человека и о правах человека», которая стала одним из первых всеобщих правовых актов в области биологии, гарантирующим соблюдение прав и основных свобод и учитывающим необходимость обеспечения свободы исследований.

В Декларации постулируется, что геном человека лежит в основе изначальной общности всех представителей человеческого рода, признания их достоинства и разнообразия и в его естественном состоянии не должен служить источником извлечения доходов. Никто не может подвергаться дискриминации на основании генетических характеристик, цели или результаты которой представляют собой посягательство на основные свободы и человеческое достоинство. Научные исследования генома человека и использование их результатов в биологии, генетике и медицине должны проводиться после тщательной предварительной оценки связанных с ними потенциальных опасностей и преимуществ, с учетом всех других предписаний, установленных национальными законодательствами. В документе декларированы принципы:

- добровольного информированного согласия заинтересованных лиц на проведение любых процедур;
- конфиденциальности генетической информации;
- права человека самому решать, быть или не быть информированным о результатах генетического анализа и его последствиях;
- права на справедливую компенсацию ущерба, причиненного в результате воздействия на геном, в соответствии с международным правом и национальным законодательством;

- доступа к достижениям науки в области биологии, генетики и медицины для каждого человека при должном уважении его достоинства и прав.

Свобода проведения научных исследований является составной частью свободы мысли. Цель прикладных исследований генома человека — уменьшение страданий людей и улучшение состояния здоровья каждого человека и всего человечества. Ученые, а также лица, принимающие политические решения в области науки, несут особую ответственность, когда речь идет об исследованиях генома человека, с учетом их этических и социальных последствий.

Этими проблемами занимается и Совет Европы, который принял в 1996 г. конвенцию о защите прав и достоинства человека в связи с приложениями биологии и медицины, или ее короткое название — «Конвенция о правах человека и биомедицине». В ней уже нашли отражение особенно близкие к генетике и геномике проблемы, например, вопросы о получении этически приемлемого согласия на проведение медицинских процедур или исследований и защите лиц, которые сами не способны дать согласие, о равном доступе всех граждан к бесплатным мероприятиям по охране здоровья, контроле качества профессиональных стандартов, недопущении дискриминации на основании генетической информации, об условиях этической приемлемости прогностического генетического тестирования, о допустимости интервенций в геном только соматических клеток человека, о запрете селекции по полу.

Конвенция Совета Европы сейчас дорабатывается в нескольких направлениях в смысле конкретизации и детализации. Работают четыре группы по 1) генетике человека, 2) эмбриологии, 3) репродукции и 4) социальным аспектам здравоохранения.

В России некоторые элементы правил поведения врача по отношению к пациенту регламентируются в Основах законодательства по охране здоровья. Однако главная особенность генетики — семейный характер их распространения, — там никак не обозначена. Существует Федеральный закон о генно-инженерной деятельности *не* на человеке. Он уже действует. Есть законопроект под тем же названием «О генно-инженерной деятельности» применительно к человеку, но он пока на стадии подготовки.

Существует проект закона «О правовых основах биоэтики и гарантиях ее обеспечения». Это один из законопроектов, который вызвал оживленные дебаты общественности, потому что оказалось, что разброс мнений относительно биоэтики в нашем обществе очень велик. Имеются ведомственные акты, касающиеся этики проведения исследовательской работы, этики проведения работ с человеческим материалом и этики работ с биоматериалом вообще.

Большое значение имеет оценка биоэтических проблем в специальной главе «Социальной концепции Русской Православной Церкви» (2000), где даны оценки основным направлениям прикладной геномики и репродуктивной медицины и их совместимости с Православием.

Представляется, что правовая и этическая регламентация медицинских приложений гентехнологий в России должна строиться с учетом международного опыта, причем в решении возникающих этических проблем требуется совместное компетентное участие медиков, генетиков, юристов, философов, социальных работников и богословов. Вместе с тем существующие системы образования мало способствуют их взаимопониманию. Особое значение имеет и повышение информированности всего общества и отдельных его групп в вопросах генетики и использования



современных генетических технологий. Это особенно важно для того, чтобы избежать в обществе как излишних страхов перед достижениями генетики, так и завышенных ожиданий, и наладить сотрудничество заинтересованных кругов в ответственном использовании результатов исследований генома человека.

## Литература

*Бочков Н.П.* Клиническая генетика. М.: «ГЭОТАР-МЕД», 2001. С. 343–350.

*Бочков Н.П.* Этические проблемы современной генетики / Материалы Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биоэтики в России». Москва, 16–17 ноября 2000 г. Москва. М.: 2000. С. 105–112.

*Иванов В.И., Ижевская В.Л.* Этика геномики: глобальный и европейский аспекты. // Человек. 1999. Т. 4. С. 5–11.

*Ижевская В.Л., Иванов В.И.* Геномика и основные биоэтические проблемы медицинской генетики // Вестн. РАМН. 2001. № 10. С. 59–64.

Council of Europe. Convention for the Protection of Human Rights and Dignity of Human Being with regard to the application of biology and medicine: Convention on Human Rights and Biomedicine (April 1997, DIR/JUR 96,14).

Council of Europe. Recommendation on genetic testing and screening for health care purposes of the European Committee of Ministers (1992. n. R92. 3).

Ethical eye: the Human Genome. Council of Europe Publishing, 2001. 145 p.

*Fletcher J.C., Berg K., Tranoy K.E.* Ethical aspects of medical genetics. A proposal for guidelines in genetic counseling, prenatal diagnosis and screening // Clinical Genetics. 1985. Vol. 27. P. 199–205.

*Holtzman N.A.* The UK's policy on genetic testing services supplied direct to public // Community Genet. 1998. Vol. 1. P. 49–52.

*Knoppers B.M., Hirtle M., Lormeau S. et al.* Control of DNA samples and Information // Genomics. 1998. Vol. 50. P. 385–401.

Medical examinations preceding employment and/or private insurance: a proposal for European Guidelines. Council of Europe Publishing, 2000. 50 p.

*Michie S., Bron F., Bobrow M., Marteau T.* Nondirectiveness in genetic counseling: an empirical study // Am. J. Hum. Genet. 1997. Vol. 60. P. 40–47.

Proposed International Guidelines on Ethical issues in Medical Genetics and Genetic Services. Report of WHO Meeting on Ethical Issues in Medical Genetics. Geneva, 15–16 December 1997. World Health Organization. Human Genetics Programme. 15 p.

*Regenauer A.* Genetic testing and insurance – a global view. Munich Re Group. 2000. 33 p.

*Richards M.* Annotation: genetic research, family life and clinical practice // J. Child Psychol. Psychiatry. 1998. Vol. 39. P. 291–305.

Services for the prevention and management of genetic disorders and birth defects in developing countries. World Health Organization. Human Genetics Programme. 1999. 100 p.

*Thomas S.M.* // British Medical Bulletin. 1995. Vol. 55, № 2. P. 429–445.

Universal Declaration on the Human Genome and Human Rights. Paris, 11 November 1997.

WHO. Control of hereditary diseases. Report of a WHO Scientific Group. 1996. 86 p.

WHO. Primary health care approaches for prevention and control of congenital and genetic disorders. 2000. 77 p.

# Геном человека как научная основа предиктивной медицины

В.С. Баранов, Е.В. Баранова, Т.Э. Иващенко

Успехи в расшифровке генома человека привели к возникновению ряда новых научных направлений, давших начало одноименным международным программам, таким как «Функциональная геномика» («Functional Genomics») (I); «Генетическое разнообразие человека» («Human Genome Diversity») (II); «Этические, правовые и социальные аспекты исследований генома человека» («Ethical, Legal and Social Implications – ELSI») (III) [Collins et al., 1998; Collins, 1999] (см. Введение, рис. 1).

## 11.1. ГЕНОМ ЧЕЛОВЕКА И МОЛЕКУЛЯРНАЯ МЕДИЦИНА

Одним из важных итогов изучения генома человека является появление и быстрое развитие качественно нового раздела медицинской науки — *молекулярной медицины*, основу которой составляет генетическая уникальность каждого человека. Характерными особенностями молекулярной медицины являются:

1) индивидуальный подход к больному (профилактика, лечение и диагностика любого заболевания основываются на генетических особенностях каждого субъекта, его генетической уникальности);

2) предупредительный (предиктивный) характер молекулярной медицины. Профилактику и лечение можно начинать заранее, до появления реальной развитой картины патологического процесса.

Хорошо известны многие практические достижения молекулярной медицины, связанные с широким внедрением молекулярных методов для решения медицинских задач: диагностика наследственных болезней, геномная дактилоскопия, фармакогеномика, генотерапия, предиктивная медицина и др. (см. Введение).

Расшифровка первичной структуры генома человека уже позволила получить информацию, принципиально важную для всех разделов медицины. «Генетизация» медицины привела к появлению молекулярной медицины. Последняя, в свою очередь, дала начало новым направлениям медицинской науки, одним из которых является *предиктивная (предсказательная) медицина*. Как следует из приведенной схемы, предиктивную медицину, в отличие от медицины лечебной и даже превентивной, уместно рассматривать как первый и наиболее ранний этап активного воздействия человека на свой организм с целью своевременной коррекции потенциально возможной патологии или патологического процесса [Baranova, 2001].

Концептуальную основу предиктивной медицины составляют представления о генетическом полиморфизме (см. гл. 2).

## 11.2. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ И ГЕНЫ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ

В отличие от мутаций, приводящих к патологическим изменениям и снижающих жизнеспособность, генетические полиморфизмы проявляются в фенотипе менее очевидно. Вместе с тем генетические полиморфизмы далеко не всегда являются нейтральными, значительно чаще они приводят к появлению белковых продуктов с несколько измененными физико-химическими свойствами и, соответственно, параметрами функциональной активности. Известно, что однонуклеотидные замены (SNP) в смысловых частях гена часто влияют на такие характеристики как изменение третичной структуры белка, стабильность его связывания с субстратом и промежуточными метаболитами, посттрансляционную модификацию, аллостерическое регулирование, температурный оптимум активности и пр. Некоторые миссенс мутации (см. гл. 2) оказывают сильное влияние на гидрофобность белка, его водородные, электростатические и сульфгидрильные связи. При этом функциональный спектр таких белков может сильно меняться от практически нейтрального эффекта генетического полиморфизма до полного нарушения функции соответствующего белкового продукта [Wang, Moulton, 2001].

Особенности спектров генетических полиморфизмов в зависимости от географических условий, диеты, расовой (этнической) принадлежности и пр. оказывают на действие естественного отбора, т.е. в определенных условиях некоторые генетические полиморфизмы могут predispose, либо наоборот, препятствовать проявлению различных заболеваний. Гены, аллельные варианты которых при наличии определенных условий predispose к определенным заболеваниям, и получили название **генов predispositionности** [Nebert, 1997]. Таким образом, *гены predispositionности* — это мутантные гены (аллели), которые совместимы с рождением и жизнью в постнатальном периоде, но при определенных неблагоприятных условиях способствуют развитию того или иного заболевания [Баранов, 2000 а, б].

В зависимости от особенностей действия и роли в метаболических процессах гены «predispositionности» условно подразделяют на гены «внешней среды», гены-«триггеры» и гены клеточных рецепторов [Баранов, 2000 а]. Именно аллельные варианты этих генов составляют основу таких частых заболеваний как атеросклероз, ишемическая болезнь сердца (ИБС), остеопороз, диабет, бронхиальная астма, опухоли и пр. Сочетания аллельных вариантов различных генов, вовлеченных в развитие каждой конкретной патологии, получили название «генных сетей» [Колчанов и др., 2000]. В каждой из таких сетей выделяют главные (центральные) гены, и дополнительные (вспомогательные) гены, называемые также *генами-модификаторами*.

Составление генной сети для каждого мультифакториального заболевания, идентификация в ней центральных генов и генов-модификаторов, анализ ассоциации их полиморфизмов с конкретным заболеванием, разработка на этой ос-

нове комплекса профилактических мероприятий для конкретного пациента составляют основу предиктивной (предсказательной) медицины [Баранов и др., 2000].

В настоящее время, как показывает анализ мировой литературы, уже могут применяться в клинической практике около 150–200 генетических тестов и разработаны панели генетических тестов для многих наиболее частых мультифакториальных болезней. Идентификация всех генов человека, открытие новых генных сетей неизмеримо увеличивают возможности генетического тестирования наследственной предрасположенности и значение медико-генетического консультирования [Collins, McKusick, 2001].

## Гены детоксикации

Гены детоксикации кодируют разнообразные ферменты, ответственные за метаболизм, деградацию, детоксикацию и выведение ксенобиотиков.

Именно эти гены, точнее их полиморфные варианты, определяют индивидуальные особенности реакции организма на различные химические препараты и пищевые продукты. Генетические полиморфизмы, приводящие к полному отсутствию соответствующего белка, либо к появлению ферментов с измененной, как правило, более низкой, чем в норме, активностью, и являются причиной выраженной индивидуальной варибельности реакций организма на лекарственные препараты, промышленные загрязнения, сельскохозяйственные яды и пр.

Многочисленные эпидемиологические исследования указывают на то, что практически все широко распространенные заболевания, включая почти 90% всех злокачественных опухолей, в той или иной мере связаны с неблагоприятными внешними факторами, среди которых видное место принадлежит курению и продуктам питания. Различные химические токсины, воздействуя на организм, могут провоцировать начало этих заболеваний. Гены, детерминирующие реакцию организма на канцерогены и экзотоксины, кодируют белки, которые по-разному взаимодействуют с канцерогенами. Поэтому в зависимости от особенностей генома различные индивидуумы могут сохранять устойчивость или, напротив, обнаруживать повышенную чувствительность к этим повреждающим агентам.

Большинство ксенобиотиков, попадая в организм, не оказывают прямого биологического эффекта, но подвергаются различным превращениям, так называемой *биотрансформации*. Биотрансформация ксенобиотиков завершается их выведением из организма. Как правило, она представляет собой многоступенчатый, «каскадный» процесс, в котором одновременно или поочередно участвуют многие ферменты детоксикации. В наиболее типичном варианте биотрансформация различных ксенобиотиков представлена трехэтапным процессом, включающим активацию (фаза 1), детоксикацию (фаза 2) и выведение (фаза 3) (рис. 86). Гены, кодирующие ферменты детоксикации, характеризуются значительным полиморфизмом первичной молекулярной структуры и обнаруживают существенные популяционные, этнические и расовые вариации, связанные с исторически сложившимися традициями, различиями продуктов питания, географической среды обитания, эпидемиями инфекционных заболеваний и пр. [Nebert, 1997]. Типичными представителями фазы 1 являются гены системы цитохромов, фазы 2 – гены семейства трансфераз. Некоторые из этих генов и их полиморфизмы приведены в табл. 26.



Рис. 86. Основные фазы детоксикации

Высокая активность различных цитохромов (фаза 1) в сочетании с низкой или нормальной активностью ферментов фазы 2 является наиболее неблагоприятным вариантом, при этом риск развития заболевания или патологического состояния резко возрастает.

Таблица 26

#### Гены детоксикации

Ген	Мутация, полиморфизм	Первичный дефект	Частота в популяции	Заболевание
<i>mEPHX</i>	exon 3 T-C Tyr-Hist	Нарушение фазы 1 детоксикации	6%	Хроническая обструкционная пневмония, эмфизема легких
<i>P4501A1 (CYP1A1)</i>	exon 7 A-G Ile -Val	Нарушение фазы 1 детоксикации	7%	Рак легких
<i>CYP2D6</i>	Del1795T точковые мутации	Нарушение фазы 1 детоксикации	40%	Болезнь Паркинсона, аутоиммунные заболевания
<i>GSTM1</i>	del/del	Нарушение фазы 2 детоксикации	40%	Рак легких, хронический бронхит, эндометриоз
<i>GSTP1</i>	313 A-G (аллель A) 341 C-T (аллель B)	Нарушение фазы 2 детоксикации	4%BB 11%AA	Болезнь Паркинсона, рак простаты, мозга, мочевого пузыря
<i>NAT-2</i>	миссенс мутации	Нарушение фазы 2 детоксикации	50%	Рак легких, мочевого пузыря, рак молочной железы, рак толстого кишечника

Так, высокая активность ферментов фазы I детоксикации (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP3A4, CYP2A6) предрасполагает к раку легких (особенно у курящих индивидуумов), а также к раку мочевого пузыря и толстого кишечника. Повышенная активность CYP1A2 может быть индуцирована табачным дымом, пережаренным мясом, некоторыми лекарствами (полибромидные бифенилы), а также диоксином. При некоторых вирусных заболеваниях (гепатиты) также происходит повышение активности этого цитохрома [Barganova, 2001]. Столь же пагубные последствия для здоровья могут иметь и патологические аллели генов эпоксидгидролаз (фаза 1). Так, отмечено, что лица, гомозиготные по «медленной» форме микросомальной эпоксидгидролазы (mEPXH), составляющие до 6% населения России, обнаруживают высокую чувствительность к действию табачного дыма, различных оксидантов, ксенобиотиков с повышенной продукцией свободных радикалов. У них чаще, чем в популяции, встречаются заболевания легких, в том числе эмфизема, хронические обструктивные пневмонии, а при наличии мутаций в гене *CFTR* заболевание муковисцидозом протекает особенно неблагоприятно.

Неполноценный (нулевой) аллель глутатион-S-трансферазы (*GSTM1*), не случайно ассоциирован с раком легких, хроническим обструктивным бронхитом, раком мочевого пузыря и даже с таким частым мультифакториальным заболеванием как эндометриоз [Barganova et al., 1997]. На фоне алкоголизма у гомозигот *GSTM1* 0/0 чаще развивается цирроз печени. Имеются многочисленные данные о предрасположенности лиц, гомозиготных по «ослабленному» аллелю гена *GSTP1* к различным опухолям, в том числе к раку кожи, а также к болезни Паркинсона.

Генетический полиморфизм гена *NAT-2*, ответственного за синтез фермента N-ацетилтрансферазы 2, может существенно влиять на возникновение рака молочной железы. Этот эффект находится в прямой зависимости от курения. У женщин, гомозиготных по медленному аллелю этого гена (медленные «ацетиляторы»), курение в молодые годы и особенно в постменопаузальном периоде увеличивает почти в 20 раз риск развития рака молочной железы. В то же время у курящих женщин, относящихся к группе быстрых «ацетиляторов», такой закономерности не отмечается.

Таким образом, по крайней мере, некоторые аллели генов «внешней среды» ассоциированы, а, возможно, и непосредственно вовлечены в возникновение ряда онкологических и неонкологических заболеваний.

## Гены мембранных рецепторов

Поступление ксенобиотиков в организм, равно как и всякие межклеточные взаимодействия регулируются рецепторным аппаратом клеточных мембран. Для многих генов рецепторных белков показано наличие полиморфизмов, а для некоторых доказано неблагоприятное фенотипическое проявление некоторых аллельных вариантов (табл. 27). В частности, функционально ослабленный аллель гена рецептора витамина D3 (*VDR3*) может предрасполагать к остеопорозу – заболеванию, возникающему при снижении минеральной плотности костей и приводящему к увеличению вероятности переломов. Аллели с низким числом CAG повторов в гене адренорецептора (*AR*) ассоциированы с раком предстательной железы. Тестирование мужчин по данному полиморфизму может оказаться по-

Таблица 27

## Гены мембранных рецепторов

Ген	Локализация	Белковый продукт	Полиморфизм / мутация	Локализация нарушения	Заболевание
<i>CCR5</i>		Хемокиновый рецептор	Del32		
<i>VDR3</i>	12q12-14	Рецептор витамина D	RFLP Bsm I	интрон 8	Остеопороз
<i>ERα</i>	6q25.1	Рецептор α эстрогена	RFLP Apa I	экзон 9	Остеопороз
			RFLP Tag I		
			RFLP Fok I	3'-область экзона 2	Остеопороз
RFLP Pvu II	интрон 1				
<i>CALCR</i>	7q21.3	Рецептор кальцитонина	RFLP Alu I	463 кодон 1377 bp экзона	Остеопороз
<i>AR</i>	Xq11.2-12	Андрогеновый рецептор	(CAG) <sub>n</sub>	экзон 1	Рак простаты

лезным для выявления особей с генетической предрасположенностью к раку простаты задолго до начала заболевания, что позволяет более рационально организовать его профилактику.

Делеция 32-х нуклеотидов в гене *CCR5*, ответственном за синтез кофактора рецептора CD4 (рецептор CD4 служит основным входом для штаммов вируса ВИЧ-1 в клетки макрофагов и моноцитов), приводит к возникновению мутантного белка с несколько измененными функциями. Белок, несущий делецию, приводит к существенному затруднению проникновения патогенного вируса иммунодефицита человека в клетки у гетерозиготных носителей мутации, или полностью блокирует проникновение — у гомозиготных носителей делеции. Высокая частота (до 14%) этого аллеля в одних популяциях и крайне низкая — у других, может иметь существенное значение в плане организации рациональной профилактики пандемии СПИДа.

## Гены-триггеры

Поломки генетических механизмов, приводящие к тяжелым мультифакториальным заболеваниям, могут быть спровоцированы мутациями в генах, играющих ключевую роль в поддержании клеточного гомеостаза. Эта полиморфная группа генов названа генами-триггерами мультифакториальных болезней. Именно к этой группе могут быть отнесены многочисленные онкогены, а также гены-супрессоры (например, *p53*), следствием мутаций которых является активация соответствующих онкогенов и включение цепи метаболических реакций, приводящих, в конечном счете, к злокачественной трансформации клеток. Для многих десятков таких генов уже идентифицированы неблагоприятные аллельные варианты, предрасполагающие к заболеваниям. Некоторые из генов-триггеров приведены в табл. 28.

Так, термолабильный вариант ключевого фермента синтеза цистеина – метилтетрагидрофолатредуктазы (MTHFR), ассоциирован с предрасположенностью к атеросклерозу и ишемической болезни сердца, с врожденными дефектами зарращения невральнoй трубки, а также с нерасхождением хромосом в женском мейозе, приводящем к болезни Дауна.

Дефектный ген ангиотензинконвертирующего фермента (ACE) ассоциирован с развитием гипертрофии миокарда и гладкой мускулатуры сосудов, а также состоянием инсулинорезистентности, что имеет существенное значение в генезе эссенциальной гипертензии, инфаркта миокарда, инсулиннезависимого сахарного диабета, диабетической нефропатии и другой сосудистой патологии. Один из аллелей (E4) гена аполипопротеина E (ApoE) ассоциирован не только с предрасположенностью к атеросклерозу, но и с болезнью Альцгеймера, хореей Гентингтона, некоторыми другими нейродегенеративными заболеваниями.

В последние годы были идентифицированы мутантные аллели гена *CC16*, предрасполагающие в гомозиготном состоянии (10% населения) к астме; мутации в гене фактора V свертывания крови резко увеличивают вероятность тромбозов; аллельные полиморфизмы гена *TGF2* коррелируют с такими частыми аномалиями внутриутробного развития как расщелина верхней губы (заячья губа) и твердого неба (волчья пасть). Группа известных триггеров мультифакториальных заболеваний сегодня насчитывает более 50 генов и быстро увеличивается.

Таблица 28

## Гены-«триггеры»

Ген	Мутация/ полиморфизм	Первичный дефект	Частота в популяции	Заболевание
<i>MTHFR</i>	677 C-T (A-V)	Гипергомоцистеинемия	5% M/M, 57% M/+	ДЗНТ КБС
<i>ACE</i>	del 287 bp Alu intr.16	Повышение активности фермента	30%	Атеросклероз Инфаркт миокарда
<i>Apo E</i>	E2, E3, E4 15% T-C Cod.112;158		15% E4/E4	Атеросклероз
<i>COL1A1</i>	Spt G-T	Увеличение уровня иРНК и нарушение соотношения между проколлагеновыми нитями $\alpha 1$ и $\alpha 2$		Пре- и постменопаузный остеопороз
<i>CC16</i>	A38G	Измененный CC16 белок	10% A/A	Астма
<i>TGF-alpha</i>	Изменение <i>Vam</i> H1 сайта экзон 6; <i>Taq1</i> сайт интрон 5	Нарушение формирования твердого неба		Волчья пасть, заячья губа



Таким образом, тестирование аллельных вариантов практически любого гена предрасположенности дает в распоряжение врача-клинициста богатую информацию о состоянии многих систем организма и позволяет оценить предрасположенность пациента сразу к нескольким различным, зачастую патогенетически далеко стоящим друг от друга заболеваниям.

Наиболее опасным для возникновения многих болезней является сочетание неблагоприятных аллелей нескольких генов с аддитивным эффектом. В частности, индивидуумы с неблагоприятными аллелями генов микросомальной эпоксидгидролазы, *CC16*, интерлейкинов 4 и 9, а также альфа-1-антитрипсина имеют особенно высокий риск хронических пневмоний, обтурационных бронхитов, эмфиземы легких и астмы. Выявить таких людей можно путем скрининга соответствующих генетических полиморфизмов. Особенно сложен генетический механизм возникновения широко распространенных мультифакториальных заболеваний, таких как диабет, атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, большинство онкологических и нервно-психических заболеваний. Складывается впечатление, что этиология и патогенез этих заболеваний зависят от неблагоприятного сочетания всех трех основных вариантов генов предрасположенности, т.е. проявления патологических мутаций соответствующих основных генов модифицируются эффектами генов-триггеров, генов детоксикации и генов-рецепторов.

В заключение необходимо подчеркнуть, что 1) тестирование генов предрасположенности носит вероятностный характер. Оно не устанавливает диагноз, но выявляет лиц с повышенным риском развития той или иной патологии; 2) с помощью соответствующих мер и рекомендаций можно уберечь их от этих заболеваний; и 3) только наличия неблагоприятных аллелей, недостаточно для развития заболевания.

### 11.3. БОЛЕЗНИ, ДОСТУПНЫЕ ДЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ТЕСТИРОВАНИЯ

Генетическое тестирование наследственной предрасположенности уже достаточно широко практикуется во многих частных лабораториях и диагностических центрах Западной Европы и Америки. В России тестирование с целью выявления наследственной предрасположенности к различным мультифакториальным болезням только начинается и сосредоточено в единичных медико-генетических лабораториях Санкт-Петербурга, Москвы, Уфы, Томска и Новосибирска. Список болезней с наследственной предрасположенностью и соответствующими им генными сетями и аллельными вариантами отдельных генов, для которых генетическое тестирование в Санкт-Петербурге уже разработано, приведен в табл. 29 [Баранов, Хавинсон, 2001].

В общей сложности этот список включает более 25 болезней, в том числе и такие распространенные как ишемическую болезнь сердца (ИБС), сахарный диабет, гипертоническую болезнь, рак молочной железы, рак легкого, рак предстательной железы, наркоманию, бронхиальную астму, остеопороз и некоторые другие.

Важно подчеркнуть, что генетическое тестирование проводится только для тех болезней, для которых в предварительных исследованиях среди больных Северо-Западного региона уже была показана неслучайная ассоциация неполноценного аллеля с соответствующей болезнью, и были проведены подсчеты эмпи-

рического риска развития заболевания. Важно подчеркнуть, что само наличие неблагоприятного аллеля не позволяет судить ни о времени начала заболевания, ни о его тяжести. Нельзя также утверждать, что обследуемое лицо наверняка заболит именно этой болезнью. Генетическое тестирование в досимптоматический период дает возможность выявить существующие пока только в геноме наследственные тенденции к развитию будущих болезней и, исходя из современного врачебного опыта, наметить пути их ранней профилактики.

В результате обследования пациент любого возраста может получить информацию о возможном риске развития у него указанных заболеваний, а врач, принимая во внимание результаты молекулярно-генетического анализа, — разработать тактику патогенетически обоснованной упреждающей терапии предполагаемого заболевания, т.е. внести необходимую медикаментозную коррекцию врожденного метаболического дефекта.

Так, назначение ингибиторов ангиотензинконвертирующего фермента (АКФ) и антагонистов рецепторов к ангиотензину II у пациентов с выявленным DD-генотипом ACE (angiotensin converting enzyme), артериальной гипертензией и начальными признаками поражения органов-мишеней обусловлено способностью этих препаратов противодействовать пролиферативным и прессорным эффектам ангиотензина II не только в сосудистой системе, но и в кардиомиоцитах. Данный подход следует рассматривать как наиболее адекватную медикаментозную профилактику дисфункции и гипертрофии левого желудочка, гипертонической болезни, ИБС и застойной сердечной недостаточности у лиц с DD-генотипом ACE. Например, уже сейчас возможно прогнозировать развитие ишемической болезни сердца в результате выявления генетической предрасположенности к дислипидемии с развитием атеросклероза сосудов, к нарушению свертывающей системы крови и процесса фибринолиза, к дисфункции эндотелия и ремоделированию сосудистой стенки, гипертрофии и ремоделированию миокарда левого желудочка. В ряде случаев у пациента ожидается высокий риск развития инфаркта миокарда до 40-50 лет, причем вероятность развития данной формы ИБС при определенных аллельных полиморфизмах исследуемых генов резко возрастает в случае чрезмерной физической нагрузки. А генетически детерминированные венозные тромбозы нередко становятся осложнениями хирургических вмешательств, переломов, приема контрацептивных препаратов и т.п. [Баранов, Хавинсон, 2001].

Развитие гипертонической болезни прогнозируется с учетом возможного повышения тонуса резистивных сосудов вследствие усиления образования ангиотензина II, обусловленного генетически детерминированным возрастанием синтеза ангиотензиногена и увеличением активности АКФ.

Известна высокая частота встречаемости аллеля E4 гена аполипопротеина E у лиц, страдающих болезнью Альцгеймера. Таким образом, исследование аллельных вариантов полиморфизма указанного гена может свидетельствовать о риске развития болезни Альцгеймера у пациентов.

Тестирование аллельных вариантов генов детоксикации фазы 1 и 2 позволяет идентифицировать индивидуумов с предрасположенностью к заболеваниям, провоцируемым неблагоприятными экзогенными факторами. Следует отметить, что выявление лиц группы высокого риска до появления признаков заболевания имеет принципиальное значение для правильного медико-генетического консультирования с последующим проведением своевременной и адекватной упреждающей терапии.

Таблица 29

Генетические полиморфизмы, ассоциированные с некоторыми заболеваниями внутренних органов и систем [Баранов, Хавинсон, 2001]

Ген и полиморфизм	Заболевание
Аполипопротеина Е (Cys112Arg, Arg158Cys) Параоксаназы (Gln192Arg) Аполипопротеина С III (C/G, позиция 5163) Аполипопротеина (а) (C/T, позиция +93) Ингибитора активатора плазминогена – 1 (4G/5G промотор, позиция –675) Ангиотензинконвертирующего фермента (I/D, интрон 16) V фактора системы свертывания крови (Arg506Gln) VII фактора системы свертывания крови (Arg353Glu) VII фактора системы свертывания крови (I/D промотор, позиция –323) Метилентетрагидрофолатредуктазы (C/T, позиция 677)	Ишемическая болезнь сердца <sup>1,3</sup>
Ангиотензинконвертирующего фермента (I/D, интрон 16) Ангиотензиногена (Met235Thr)	Гипертоническая болезнь (эссенциальная гипертензия) <sup>1,3</sup>
Аполипопротеина Е (Cys112Arg, Arg158Cys)	Болезнь Альцгеймера <sup>1</sup>
Семейства главного комплекса гистосовместимости HLA DR и DQ (аллели DR3 и DR4) Mic-A (5 копийный повтор 3 нуклеотидов в экзоне 5) VDR3 (FokI, ApaI, TaqI полиморфизмы – f, a, t аллели)	Сахарный диабет I типа <sup>3</sup>
Ангиотензинконвертирующего фермента (I/D интрон 16) Эндотелиальной NO-синтазы (4 и 5 копийные повторы 27 нуклеотидов в интроне 4)	Диабетическая нефропатия при диабете I типа <sup>3</sup>
Ангиотензинконвертирующего фермента (I/D, интрон 16) Ингибитора активатора плазминогена – 1 (4G/5G промотор, позиция –675)	Сахарный диабет II типа <sup>1</sup>
GSTM 1 (0/0) GSTT1 (0/0) GSTP1 (аллель В) L-MYC (L/S, интрон 2) CYP-17 (Msp A1–/Msp A1+) CYP-19 (TTTA, интрон 5) p53-6 (Msp1+ / Msp 1–, интрон 6) p53-16 (119/135, интрон 3) p53-72 (Bst U1+ / Bst U1–, экзон 4)	Рак молочной железы <sup>2,3</sup>
GSTM 1 (0/0) GSTT1 (0/0) NAT-2 (S/S медленная форма) CYP1A1 (Ile/Val полиморфизм, экзон 7) p53-6 (Msp1+ / Msp 1–, интрон 6) p53-16 (119/135, интрон 3) p53-72 (Bst U1+ / Bst U1–, экзон 4) L-MYC (L/S, интрон 2)	Рак легкого <sup>2,3</sup>

Таблица 29 (окончание)

Ген и полиморфизм	Заболевание
<i>HPV</i> <i>p53-6</i> (Msp1+ / Msp 1-, интрон 6) <i>p53-16</i> (119/135, интрон 3) <i>p53-72</i> (Bst U1+ / Bst U1-, экзон 4)	Рак шейки матки <sup>2</sup>
<i>GSTM 1</i> (0/0) <i>GSTT1</i> (0/0) <i>NAT-2</i> (S/S медленная форма)	Рак толстой кишки <sup>3</sup>
<i>GSTM 1</i> (0/0) <i>GSTT1</i> (0/0)	Рак мочевого пузыря <sup>3</sup>
андрогенного рецептора (AR) <i>p53-6</i> (Msp1+ / Msp 1-, интрон 6) <i>p53-16</i> (119/135, интрон 3) <i>p53-72</i> (Bst U1+ / Bst U1-, экзон 4)	Рак предстательной железы <sup>2,3</sup> Гиперплазия предстательной железы <sup>2</sup>
<i>L-MYC</i> (L/S, интрон 2) <i>p53-6</i> (Msp1+ / Msp 1-, интрон 6) <i>p53-16</i> (119/135, интрон 3) <i>p53-72</i> (Bst U1+ / Bst U1-, экзон 4)	Неблагоприятный прогноз течения некоторых онкологических заболеваний <sup>2</sup>
рецептора дофамина <i>DRD-2A</i> (Taq 1+ / Taq 1-) <i>DRD-2B</i> (Taq 1+ / Taq 1-)	Предрасположенность к патологическим пристрастиям: наркомании, табакокурению, алкоголизму <sup>2</sup>
<i>GSTM 1</i> (0/0) <i>GSTT1</i> (0/0)	Бронхиальная астма <sup>3</sup>
метилентетрагидрофолатредуктазы MTHFR (C/T, позиция 677) метионинсинтезредуктазы MTRR (A/G, позиция 66)	Дефект зарращения невральнoй трубки <sup>3</sup>
фактора V (G/A, позиция 1691)	Наследственная тромбофилия <sup>1,3</sup>
<i>mEPHX</i> (Y113H, T/C, экзон 3)	Хронический обструктивный бронхит, эмфизема легких <sup>3</sup>
<i>VDR3</i> (T/C, экзон 9, Taq1 сайт) <i>COL1A1</i> (G/T, позиция 1377, Sp1 сайт) <i>CALCR</i> (T/C, позиция 447, Alu I сайт)	Остеопороз <sup>3</sup>
<i>CCR-5</i> (del 32)	Устойчивость к ВИЧ-инфекции <sup>3</sup>
<i>IT-15</i>	Хорея Гентингтона <sup>3</sup>
<i>GSTM 1</i> (0/0) <i>NAT-2</i> (S/S медленная форма)	Эндометриоз <sup>3</sup>
<i>GSTM 1</i> (0/0) <i>GSTT1</i> (0/0) <i>GSTP1</i>	Привычное невынашивание плода <sup>3</sup>

Установлено, что у курильщиков, имеющих делеции в генах *GSTM1* и *GSTT1* и, как следствие, лишенных этих ферментов, риск заболеть раком легких примерно в три раза выше по сравнению с курильщиками без дефицита этих ферментов. Еще выше (почти в 20 раз) риск рака молочной железы у курящих женщин с дефицитом *GSTM1* и медленной формой N-ацетилтрансферазы (*NAT-2*).

Исследование онкогена *L-MYC* показало взаимосвязь его полиморфизма с развитием пролиферативных процессов, в основном, в легких и молочных железах, а также с быстрым вовлечением в процесс метастазирования лимфатических узлов. Продуктом гена *CYP-19* является ароматаза. Как известно, ферментный комплекс ароматазы отвечает за превращение андрогенов С19 в эстрогены. Изменение активности гена *CYP-19* является важным механизмом аутокринной регуляции роста опухоли. Исследование аллельных полиморфизмов генов *CYP-17* и *CYP-19* позволяет прогнозировать риск развития опухолей преимущественно в молочных железах. Изучение аллельных полиморфизмов гена *p53* позволяет судить о полноценности его супрессорной функции в случае развития пролиферативных процессов в организме. Распределение аллелей гена адренорецептора коррелирует с активностью соответствующего рецептора, а повышенная андрогенная стимуляция является одной из причин развития рака предстательной железы и характеризуется быстрым метастазированием первичной опухоли.

Комплексное тестирование генов внешней среды и генов рецепторов, в том числе и генов метаболизма лекарств, позволяет не только идентифицировать индивидуумов с «быстрым» и «медленным» типами метаболизма ксенобиотиков, но и определять индивидуальную чувствительность к различным фармакологическим препаратам [Motulsky, 1999]. Более того, именно таким образом можно подобрать индивидуальную дозировку различных лекарств и приблизиться к идеальной схеме индивидуального лечения, т.е. к решению основной задачи фармакогенетики [Nebert, Carvan, 1997].

Тестирование генов-триггеров, продукты которых играют ключевую роль в метаболических процессах, имеет важное значение для оценки индивидуальной предрасположенности к различным мультифакториальным болезням. Изучение полиморфизма таких генов позволяет анализировать особенности индивидуальной предрасположенности к остеопорозу, эндометриозу, ВИЧ-инфекции, ко многим онкологическим заболеваниям. Аллельный полиморфизм многих других генных локусов обнаруживает несомненную ассоциацию с диабетом, атеросклерозом, гипертонической болезнью, ИБС, многими психическими заболеваниями.

Таким образом, в настоящее время уже на основе имеющихся данных вполне оправданно тестирование многих генетических полиморфизмов, ассоциацию которых с тяжелыми заболеваниями можно считать доказанной.

Наш собственный опыт и анализ состояния проблемы в мире убеждают в том, что уже сегодня возможности предиктивной медицины весьма значительны. В ближайшие годы прогнозируется бурный рост этого нового направления [Collins, McKusick, 2001].

Индивидуальный подход к пациенту, основанный на научной интерпретации результатов генетического исследования и их сопоставления с данными клинических, лабораторных и инструментальных методов исследования, позволяет осуществить раннюю диагностику генетически детерминированных заболева-

ний и предложить максимально эффективную схему профилактических и лечебных мероприятий для предупреждения развития патологического процесса.

Таким образом, сегодня молекулярные исследования широко вошли в медицинскую практику. Каждый человек может получить достаточно полную информацию об уникальных особенностях своего генома, в том числе и о состоянии своих генов «предрасположенности».

## 11.4. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ КАРТА (ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПАСПОРТ)

В настоящее время во многих диагностических центрах России широко применяются молекулярные методы с целью диагностики генных болезней, выявления гетерозиготного носительства патологических мутаций в семьях высокого риска, для досимптоматической диагностики болезней с поздней манифестацией и с целью идентификации личности (*геномной дактилоскопии*). Постепенно набирает силу генетическое тестирование в рамках предиктивной (предсказательной) медицины. Очевидно, что в результате этих исследований происходит накопление генетических данных как о геноме отдельных индивидуумов, так и о целых семьях, т.е. постепенно формируются индивидуальные и семейные базы ДНК-данных. Такая база ДНК-данных и является «генетическим паспортом». Информация, содержащаяся в этом поистине уникальном документе, должна помочь избежать жизненных коллизий, связанных с игнорированием индивидуальных особенностей своего генома, т.е. своей наследственности. Она позволяет полнее реализовать свои врожденные генетические способности и представляет несомненную ценность для потомков.

Повсеместное внедрение в современную медицину методов молекулярной диагностики уже сделало реальной идею создания генетического паспорта. Он уже существует *de facto*, и число генетических тестов, составляющих его основу, быстро увеличивается (рис. 87).

Важно отметить, что генетическая карта в полном варианте должна включать результаты исследования не только генов предрасположенности, но и бессимптомного носительства мутаций генов наиболее частых наследственных болезней (гемофилии, муковисцидоза, фенилкетонурии и др.). Кроме того, такой паспорт должен содержать информацию о кариотипе пациента, а также его уникальный генетический номер. В настоящее время диагностические возможности существующих молекулярных лабораторий и центров России, в том числе и Санкт-Петербурга, позволяют обеспечить достаточно полный набор таких генетических тестов. Один из вариантов «генетического паспорта», разработанного в лаборатории пренатальной диагностики наследственных болезней НИИАГ им. Д.О. Отта РАМН, приведен на рис. 88.

В ближайшем будущем такой генетический паспорт может быть рекомендован к применению в клинической практике, а генетическое тестирование станет столь же рутинным, как и другие лабораторные анализы (определение группы крови и резус-фактора, тесты на инфекционные болезни и пр.).

Согласно рекомендациям ВОЗ, генетическое тестирование должно проводиться с учетом добровольного, сознательного согласия тестируемого. Формаль-

## ПЕРСОНАЛЬНАЯ ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ФОРМА

(индивидуальная база данных)



Рис. 87. Персональная генетическая форма

но это означает, что важная генетическая информация может быть получена сравнительно поздно, когда ее полезность для обследуемого и его близких родственников уже в значительной мере утрачена. Однако, принимая во внимание значение этих данных для здоровья ребенка, гармоничного формирования его личности, рационального питания, эффективного образования, спортивных занятий, оптимальной профориентации и пр., составление такого генетического паспорта в раннем возрасте представляется вполне оправданным уже сегодня.

Нельзя исключить, что по мере решения этических и социальных проблем, связанных с исследованиями генома человека, генетическое тестирование будет проводиться значительно чаще и в более раннем возрасте, чем рекомендуется в настоящее время.

Составление генетического паспорта любого объема для дееспособных граждан должно приветствоваться. Данный медицинский документ оказал бы существенную помощь при проведении экспертизы состояния здоровья подростков, а также оценки потенциального риска развития ряда заболеваний у юношей призывного возраста.

**"ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПАСПОРТ"**

Год 2007

Идентификационный номер 4 5 1 2 7 1 3 1 9 3 7 4 8  
национальность -

Картиотип -2п = 46,XX;  
Транслокация/инверсия  
Прочее

Семейный риск  
муковисцидоза

F508/+

Тест на гетерозиготность  
MB CFTR F508/+  
МДД Dystrophin +/-  
ГА FVIII +/-  
ФКУ РАН +/-  
ATC CYP21B +/-  
CMA SMN +/-

Досимптоматическая диагностика

1. Нейродегенеративные заболевания  
HD +/-; SCA1 +/-; DRPLA +/-  
AR +/-; SCA2 +/-; MP1 +/-
2. Рак груди  
BRCA1 185delAG/+; BRSA2 +/-
3. Семейный аденоматозный полипоз  
(FAP) APC +/-
4. Болезнь Альцгеймера  
PS-1 +/-; PS-2 +/-.
5. Прочее

Скрининг генов "предрасположенности"

А/гены "внешней среды"  
CYP2D6; CYP1A1-Ile/Ile;  
mEPHX S/S; NAT-2 S/R; GSTM1 0/0  
В/ онкогены p53  
RAS  
другие  
С/ гены-"триггеры"  
Дефекты нервной трубки  
MTHFR 833 T-C/+  
Остеопороз VDR 3 T/T  
Атеросклероз MTHFR 677 C-T/+  
Apo E E2/E4  
Инфаркт миокарда ACE 287bp Ins/Del  
Рак простаты AR  
Диабет IDDM1 - HLA DR3/DR4  
IDDM2; IDDM3, IDDM4  
Риск СПИДа 32delCCR5/+

Геномная дактилоскопия

vWF 4/5; ApoB 12/7; AR  
13/19 HPRT 3/7; STRX1 4/8  
HLA

**МЕДИКО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ КОНСУЛЬТИРОВАНИЕ  
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ СЕМЕЙНОМУ  
ДОКТОРУ, РОДИТЕЛЯМ, ПАЦИЕНТУ**

Рис. 88. Предполагаемый «генетический паспорт»

Чрезвычайно актуальным представляется генетическое тестирование для лучших супругов, спортсменов-профессионалов, людей экстремальных профессий и лиц, просто заинтересованных в информации о собственном геноме. Серьезно обсуждается большая практическая значимость генетической карты беременной, один из вариантов которой разработан в Институте акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта РАМН (рис. 89).





Рис. 89. Вариант «генетической карты» беременной

## 11.5. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ТЕСТИРОВАНИЯ

Максимальная польза от генетического паспорта может быть достигнута только в том случае, если генетическое тестирование будет завершаться полноценной консультацией высококвалифицированного специалиста по медицинской генетике, с соответствующими рекомендациями для лечащего врача и пациента. Эти рекомендации должны касаться не только конкретной патологии, но и носить значительно более развернутый характер, содержать информацию, необходимую для максимально эффективной полноценной и здоровой творческой жизни обследуемого. В случае установления фактов наследственной предрасположенности к тому или иному заболеванию особенно важной представляется разработка комплекса конкретных диагностических манипуляций и лечебно-профилактических рекомендаций, направленных на предотвращение развития прогнозируемых заболеваний у обследуемого [Баранов, Хавинсон, 2001].

Существенную помощь в правильной интерпретации полученных результатов может оказать компьютерная программа SESAM (System Expert Spécialisée aux Analyses Médicales), разработанная в 1998–1999 гг. во Франции (L. Chapy, H. Baranova) [Baranova, 2001]. Эта компьютерная программа уже сейчас широко используется в повседневной медицинской практике. Программа SESAM основана на интерпретации результатов генетического тестирования, а также результатов биохимических, серологических, иммунологических анализов (всего свыше 80 тестов) при помощи специальной компьютерной программы РРМА (Predictive and Preventive Medical Access) и включает собственно экспертную систему, программу обучения и тренинга для практических врачей, раздел медицинского консультирования и справочник для населения.

**Экспертная система (ЭС)** является главной частью РРМА. Она позволяет на основе компьютерного анализа результатов многочисленных лабораторных тестов, особенностей привычек, образа жизни, данных анамнеза и клинических симптомов провести объективный анализ состояния здоровья пациента, прогнозировать течение болезни, тактику и стратегию лечения больного. Отличительными свойствами программы являются:

**Точность.** Экспертная система основана на обширной базе данных (свыше 30 000 случаев), позволяющей давать свыше  $30 \times 10^9$  вариантов ответов.

**Интерактивность.** Программа способна оценивать генетические и другие лабораторные тесты в зависимости от имеющихся клинических и анамнестических факторов, осуществлять сравнение и интерпретировать их результаты.

**Динамичность.** В случае нескольких тестов в разное время система позволяет представлять картину заболевания в динамике.

**Рекомендации по лечению.** Подбор на основе генетических и других лабораторных тестов оптимальной строго индивидуальной схемы медикаментозного лечения.

Программа РРМА безусловно полезна для обучения предиктивной медицине врачей и медицинского персонала. Она включает многочисленные статистические данные и математические методы, позволяющие проводить популяционные исследования, в том числе анализ результатов фармакотерапии, подбор диет, исследование воздействия на организм средовых и генетических факторов и многое другое.

Особенно существенный вклад вносит данная программа в предиктивную медицину. Показательно, что основной упор при этом делается на интерпретацию результатов различных генетических тестов и, прежде всего, тестов по определению аллельных полиморфизмов генов детоксикации (см. раздел 11.2).

В заключение отметим, что появление данной программы в системе Интернет уже сегодня может способствовать быстрому внедрению принципов и методов предиктивной медицины в клиническую практику и в нашей стране.

Необходимость такой программы продиктована всем ходом становления и развития предиктивной медицины. Действительно, информация об особенностях аллельного паттерна генов из разных генных сетей, обработанная с помощью программы РРМА, либо ее аналога, позволит врачу-генетику получить достаточно объективную информацию о предрасположенности субъекта к тому или иному заболеванию, более обосновано судить о его медицинском прогнозе, более аргументировано проводить медико-генетическое консультирование по вопросам специального образования, выбора профессии, занятий спортом и пр.

В ряде случаев, особенно при досимптоматическом тестировании, полученные результаты могут повлечь за собой конкретные рекомендации по профилактике того или иного заболевания. По мере уточнения и увеличения числа генных сетей различных мультифакториальных заболеваний все более объективная информация может быть получена с помощью генетического тестирования и в отношении таких частых и трудных для лечения заболеваний как диабет, остеопороз, эндометриоз, астма, атеросклероз и многие другие. Показательно, что по инициативе ВОЗ уже изданы серии методических рекомендаций по доклиническому выявлению лиц высокого риска тромбофилии, гиперхолестеринемии, гемохроматоза, дефицита  $\alpha_1$ -антитрипсина.

В настоящее время, как показывает анализ мировой литературы, доступны для клинического применения около 150–200 генетических тестов. Идентификация всех генов человека, открытие с помощью биоинформатики новых генных сетей, неизмеримо увеличит возможности генетического тестирования наследственной предрасположенности и медико-генетического консультирования [Mahowald et al., 1998].

## Заключение

Предиктивная медицина, т.е. медицина, основанная на клиническом понимании функций генома, его составных частей — генных ансамблей и индивидуальных генов, делает только первые шаги. По мере идентификации новых генов и генных сетей, выяснения их функций с помощью протеомики, новых данных о метаболических путях, информации о молекулярных механизмах, лежащих в основе тех или иных морфогенетических процессов, равно как и отдельных заболеваний, особенно мультифакториальных, роль предиктивной медицины в здравоохранении будет стремительно возрастать. В главе приведены лишь основные известные на сегодня гены, ассоциации которых с соответствующими болезнями уже установлены. Нет сомнения, однако, в том, что все это — только начальный этап в процессе познания роли отдельных генов и их ансамблей в патогенезе сложных мультифакториальных болезней. Число генов в генных сетях будет неуклонно возрастать, а роль отдельных генов будет пересматриваться.

Важно обратить внимание на наметившийся в последнее время разрыв между реальными возможностями генетического тестирования как комплекса молекулярных методов и явным недостатком продуманных клинических рекомендаций, которыми должно завершаться каждое генетическое тестирование. Широкое привлечение к решению этих вопросов специалистов по медицинской генетике, компетентных в вопросах диспансеризации и фармакотерапии, а также врачей-клиницистов соответствующего профиля (кардиологов, онкологов, пульмонологов, акушеров-гинекологов и др.), владеющих основами профилактической (предиктивной) медицины, в настоящее время представляется особенно актуальным.

Более того, следует подчеркнуть, что любое генетическое тестирование в рамках предиктивной медицины оправдано лишь в том случае, когда его результаты подкреплены серьезными медицинскими рекомендациями. Только при наличии грамотных специалистов по медицинской генетике, своевременно и правильно направляющих пациентов на предиктивное тестирование, и, что еще более важно, способных давать квалифицированные рекомендации по результатам такого тестирования, можно приступать к такому тестированию. Само по себе генетическое тестирование, не подкрепленное квалифицированной медико-генетической консультацией, а при необходимости, и рекомендациями соответствующих специалистов, лишено смысла и, по большому счету, может быть только вредным.

## Литература

Баранов В. С. Программа «Геном человека» как научная основа профилактической медицины // Вестн. РАМН. 2000а. № 10. С. 27–37.

*Баранов В.С.* Молекулярная медицина: молекулярная диагностика, превентивная медицина и генная терапия // Мол. биол. 2000б. Т. 34, № 4. С. 684–695.

*Баранов В.С., Баранова Е.В., Иващенко Т.Э., Асеев М.В.* Геном человека и гены «предрасположенности». Введение в предиктивную медицину. СПб: Интермедика. 2000. 271 с.

*Баранов В.С., Хавинсон В.Х.* Определение генетической предрасположенности к некоторым мультифакториальным заболеваниям. Генетический паспорт / Ред. Хавинсон В.Х. СПб.: ИКФ-«Фолиант». 2001. 48 с.

*Горбунова В.Н., Баранов В.С.* Введение в молекулярную диагностику и генотерапию наследственных заболеваний. СПб.: «Специальная литература». 1997. 287 с.

*Зеленин А.В.* Генная терапия на границе третьего тысячелетия // Вестн. РАН. 2001. Т. 71, № 5. С. 387–404.

*Иванов В.И., Юдин Б.Г.* Этико-правовые аспекты программы «Геном человека». М. 1998. 189 с.

*Пузырев В.П., Степанов В.А.* Патологическая анатомия генома человека. Новосибирск: Наука. 1997. 223 с.

*Свердлов Е.Д.* Очерки современной молекулярной генетики по курсу лекций для студентов биологического факультета МГУ. Очерк 6. Генная терапия и медицина XXI века // Мол. генет., микробиол., вирусол. 1996. № 4. С. 3–32.

*Харрингтон С., Макги Дж.* Молекулярная клиническая диагностика. М: Мир. 1999. 558 с.

*Baranova H., Perriot J., Albuissou E. et al.* Peculiarities of the GSTM1 0/0 genotype in French heavy smokers with various types of chronic bronchitis // Hum. Genet. 1997. Vol. 99. P. 822–826.

*Baranova H.* Predictive medicine – what is it about? / Int. Congr. in Predictive Medicine. Program and Abstracts. Vichy. France. 2001. P. 3–7.

*Collins F.S.* Shattuck Lecture. Medical and Societal Consequences of the Human Genome Project // New Engl. J. Med. 1999. Vol. 341. № 3. P. 28–37.

*Collins F.S., Patrions A., Jordan E. et al.* New goals for the US Human Genome Project: 1998–2003 // Science. 1998. Vol.282. P.682–689.

*Collins F.S., McKusick V.A.* Implications of the Human Genome Project for medical science // JAMA. 2001. Feb 7. Vol. 285. № 5. P. 540–544.

EUROGAPP Project / Population Genetics Screening Programs: Principles, Techniques, Practices and Policies. 2000. 65 p.

*Mahowald M.B., Verp M.S., Anderson R.R.* Genetic Counselling: Clinical and ethical challenges // Ann. Rev. Genet. 1998. Vol. 32. P. 547–549.

*Nebert D.W., Carvan M.J.* Ecogenetics: from biology to health // Toxicol. Indust. Health. 1997. Vol. 13. P. 163–192.

*Nebert D.W.* Polymorphisms in drug metabolising enzymes: what is their clinical relevance and why do they exist? // Am. J. Hum. Genet. 1997. Vol. 60. P. 265–271.

*Wang Z., Moul J.* SNPs, protein structure and disease // Hum. Mut. 2001. Vol.17. P. 263–270.

WHO Reports "Proposed International Guidelines on Ethical Issues in Medical Genetics and Genetic Services. WHO Human Genetics Program. 1998. 15 p.

# Геномика – медицине

## Заключение

*В.С. Баранов, Л.Л. Киселев*

Расшифровка первичной структуры генома – важнейший, но только первый шаг на пути познания глубинных основ наследственности человека. В предшествующих главах книги нашли отражение те направления медицинской науки, которые возникли в процессе подготовки черногового варианта генома. Их реальный вклад в медицину уже вполне ощутиим.

Прежде всего, это относится к проблемам диагностики, лечения и профилактики моногенных наследственных болезней. Можно констатировать, что геномика уже проникла во все разделы современной медицины. Более того, бурное развитие науки не оставляет сомнения в том, что взаимопроникновение геномики и медицины с каждым годом будет становиться все более активным. Такой союз потребует уже в ближайшее время серьезной перестройки здравоохранения, медицинского образования и медицинской промышленности. Но, главное, перестройка должна затронуть подготовку всех медицинских кадров в плане углубленного изучения геномики, использования ее достижений в повседневной клинической и лабораторной практике.

Поэтому, подводя итоги, нам казалось уместным познакомить читателей с некоторыми новыми направлениями и тенденциями развития геномики в «постструктурную» эру.

Следует отметить, что бурное развитие геномики уже сегодня ведет к быстрой трансформации ее традиционных направлений. От изучения тонкой молекулярной организации генома, его анатомии, активно происходит переход к геномике функциональной, в частности, к транскриптомике, изучающей контролирующую механизмы транскрипции генетической информации, и к протеомике, изучающей регуляцию синтеза, созревание, деградацию и взаимодействие белков.

В 2002 г. появился новый термин – *РНКомика*. Из названия следует, что речь идет об РНК – ДНК, переписываемых в РНК. В самое последнее время было обнаружено, что в клетках содержится огромное количество так называемых *малых РНК*, или *интерферирующих РНК* (RNAi), которые оказались мощными регуляторами генной активности на уровне генных продуктов. Взаимодействуя с другими РНК, играющими роль матриц при белковом синтезе (мРНК), они разрушают эти матрицы, не позволяя данному гену «дойти» до синтеза кодируемого им белка. Совершенно очевидно, что изучение совокупности этих RNAi – важный, совершенно новый раздел функциональной геномики, бурное развитие которого, происходящее у нас на глазах, окажет значительное влияние на молекулярную медицину, так как создаст новые возможности коррекции активности генов и влияния на состав белков в клетках.

В молекулярной медицине основной упор делается на изучение мультифакториальных болезней. Теперь вместо исследования одного гена изучают генные ансамбли, их взаимодействие и принципы регуляции.

Появился еще один новый термин — «*генные сети*», отражающий то обстоятельство, что большинство воздействий на клетки (стресс, температура, условия питания, аэрации, патологические процессы) затрагивают, как мы теперь знаем, не одиночные гены, а их множество. Генная сеть обеспечивает межгенные корреляции путем сложных регуляторных процессов, которые пока изучены совершенно недостаточно, точнее сказать, почти не изучены. Медикам, хотя бы они того или не хотят, для глубинного познания патогенеза большинства болезней придется иметь дело не только с «больными» отдельными генами, но и с генными сетями. Исследования этиологии моногенных болезней (поиск генов и идентификация мутаций) постепенно уступают место работам по изучению их патогенеза, поскольку «больные» гены уже идентифицированы.

Важными условиями успеха таких исследований являются точность расшифровки молекулярной структуры генома (возможная частота ошибки при секвенировании не более 1 на 10 000) и выяснение функции всех генов человека. Быстрое развитие биоинформатики в сочетании с новыми молекулярными технологиями, позволяющими не только автоматизировать процесс секвенирования, существенно повысили его эффективность, но и судить о работе новых генов и целых генных ансамблей, доказывает реальность таких планов. Немало способствует тому и *сравнительная геномика*: в частности, расшифровка генома лабораторной мыши — традиционного модельного объекта для различных генетических, биохимических, иммунологических и прочих исследований. Проведенные в конце 2002 г. первые сравнения первичных структур геномов человека и лабораторной мыши позволили установить их высокую гомологию (сходство первичной структуры 80% генов). Выяснять функции новых генов в экспериментах на мышцах значительно проще, чем на человеке. При этом наиболее консервативной частью генома оказались примерно 5% ДНК, состоящие преимущественно из повторяющихся нуклеотидных последовательностей. Этот факт позволил высказать очень интересную гипотезу, согласно которой именно в этой фракции ДНК, ранее рассматриваемой как «бессмысленной» и даже «эгоистической» (см. Введение), в действительности может быть кодирована программа индивидуального развития, всего онтогенеза, сохранившаяся неизменной в течение примерно 75 млн лет, эволюционно разделяющих человека и мышшь. Похоже, однако, что программа онтогенеза записана каким-то другим языком, отличным от традиционного трехбуквенного кода, используемого природой для синтеза белков. Не исключено, что многие заболевания человека могут иметь в своей основе патологию информации развития.

Новые молекулярные технологии, позволяющие эффективно дискриминировать промоторные области структурных генов, изучать белковые взаимодействия, анализировать множественные смысловые однонуклеотидные замены (SNP) или одновременно экспрессию сразу многих генов, безусловно открывают новые возможности для медицины в плане диагностики, лечения и профилактики заболеваний. Сегодня ежедневно идентифицируется около 100 генов. Быстро накапливается новая информация в уже сформировавшейся цепочке — ГЕНОМ — ТРАНСКРИПТОМ — ПРОТЕОМ — МЕТАБОЛОМ. При этом под **транскриптомом** понимают все транскрибируемые РНК-последовательности, под **протеомом** — все белки, кодируемые геномом, и **метаболомом** — межбелковые взаимодействия в процессах метаболизма (жизнедеятельности организма).

Изобретено еще одно слово — *целлом* (от английского cell — клетка), отражающее тенденцию мировой биологии к интеграции знаний, полученных на разных уровнях. Имеется в виду, что сумма знаний, добытых геномикой, транскриптомикой, протеомикой, биоинформатикой, должна быть объединена в целостную картину жизни клетки. Уместно напомнить, что любая молекула, будь то ДНК или РНК, работает только в клетке. Клетка — элементарная единица жизни подобно тому, как ген — элементарная единица наследственности.

Не случайно уже обсуждаются проекты реконструкции клетки из ее компонентов, т.е. искусственное создание «минимальной» клетки, обладающей всеми признаками живого (способной размножаться, не меняя своих свойств, реагировать на изменения окружающей среды и т.д.). Создание минимальной клетки открывает новые возможности для молекулярной медицины, так как позволит быстрее испытывать новые лекарства в условиях, максимально близких к условиям организма. Конечно, создание минимальной клетки — дело будущего, но это будущее может наступить быстрее, чем кажется многим сейчас.

Ученые предполагают, что весь XXI век уйдет на выяснение фенотипических проявлений разных генетических полиморфизмов на клеточном, тканевом, органном и организменном уровнях. В ходе таких исследований будут расшифрованы метаболические цепочки, связывающие разные гены. Проведение параллельных исследований на таких биологических моделях, как дрозофила и мышшь, геномы которых уже расшифрованы, позволит выяснить тонкие механизмы патогенеза различных, в том числе, и особенно частых, полигенных заболеваний.

Наиболее значимые открытия в области ДНК-диагностики касаются использования *высокоэффективных микрочиповых и планшетных технологий*, позволяющих одновременно проводить идентификацию сразу многих сотен полиморфизмов в одном или многих генах, что важно для диагностики многих моногенных заболеваний, или одной мутации (полиморфизма) при выполнении скринирующих программ или массовых популяционных исследований. Методы ДНК-чипов (ДНК-фингерпринта) уже начинают находить применение в диагностике различных опухолей, а также различных соматических и психических заболеваний.

В качестве ближайших перспектив рассматривают *метод диагностики путем скринирования однонуклеотидных полиморфизмов (SNP)*, рассеянных по геному, а также с помощью экспрессионных чипов, позволяющих одновременно изучать работу 10–15 000 генов. Высказывают почти фантастическое предположение, что анализа экспрессии всех генов будет достаточно для точной диагностики многих заболеваний, поскольку каждой болезни должен соответствовать свой, характерный только для нее, экспрессионный профиль («паттерн»). Следует иметь в виду, что анализ экспрессионных профилей заболевания требует наличия клонотеки кДНК пораженной ткани или органа, которая не во всех случаях доступна.

Вместе с тем не вызывает сомнения, что скринирование однонуклеотидных замен в индивидуальном организме позволяет установить уникальный геномный профиль каждого человека. Появляется реальная возможность вести массовый скрининг функционально неполноценных аллелей для многих, а в недалеком будущем — и для всех, генов и, таким образом, выяснить наследственную предрасположенность человека к различным, в том числе и к наиболее частым мультигенным заболеваниям (диабет, гипертония, астма, атеросклероз, различные опухоли, психические заболевания и другие).

Пока стоимость исследования всех полиморфизмов одного человека очень высока. Уместно, однако, обратить внимание практикующих врачей на то, что анализ полиморфизмов генов детоксикации позволяет еще до начала лечения определить индивидуальную чувствительность организма к предлагаемым лекарственным препаратам и наметить наиболее эффективные пути адекватного лечения. Такие исследования уже применяются на практике в отношении ряда мультифакториальных заболеваний, таких как эндометриоз, бронхиальная астма и др.

Все больший интерес у врачей вызывает предлагаемый специалистами «*геномный паспорт*» (см. гл. 11). По мнению ведущих ученых программы «Геном человека» Фрэнсиса Коллинза, Виктора МакКьюсика и Лины Пелтонен [Collins, McKusick, 2001; Peltonen, McCusick, 2001], медицинская карта пациента уже в недалеком будущем будет включать сведения о геноме, а также каталог его полиморфных маркеров — SNP. Эти данные позволят определить не только к каким заболеваниям человек предрасположен, но и его чувствительность к лекарствам и другим внешним агентам. Наличие такой информации открывает новые, невиданные ранее возможности для индивидуальной (персонифицированной) медицины. Она позволит лечить каждого человека как биохимическую и генетическую индивидуальность. Вместе с тем необходимо отметить, что на пути к широкому внедрению персонифицированной (предиктивной) медицины существуют и реальные трудности. Прежде всего, они связаны со сложностями интерпретации результатов геномного (предиктивного) тестирования, которые требуют углубленных эпидемиологических и популяционных исследований, досконального знания геной сети каждого заболевания, выяснения реального вклада каждого гена в патологический процесс, роли экзогенных факторов в возникновении заболевания. Существенным препятствием является и отсутствие адекватных юридических норм и законов, регламентирующих генетическое тестирование.

Наиболее продвинутым в этом плане является тестирование генов детоксикации, определяющих индивидуальную чувствительность к лекарственным препаратам. Выяснение уникального «лекарственного» профиля каждого человека уже в обозримое время станет стандартной процедурой, и, наряду с группой крови и другими важнейшими данными лабораторного и клинического обследования пациента, эти результаты будут, по-видимому, вноситься в индивидуальную медицинскую карту. В настоящее время такое генетическое тестирование рекомендуется только для взрослых пациентов, но в семьях высокого риска следует обследовать и детей.

Не исключено, что в недалеком будущем геномное тестирование сможет применяться при обследовании новорожденных, по крайней мере, в отношении некоторых наиболее частых моногенных и полигенных заболеваний, для которых есть хорошо разработанная схема лечения и, что существенно, профилактики.

Следует подчеркнуть, что корректная интерпретация результатов геномного тестирования, сообщаемых пациентам, является основной задачей предиктивной медицины сегодняшнего дня. По мере углубления знаний в области современной геномики, совершенствования системы тестирования, методов профилактики и лечения заболеваний характер интерпретации и рекомендаций может меняться. Однако в любом случае объективность и, главное, полезность тестирования, будут определяться уровнем подготовленности врачей, направляющих пациентов на такое тестирование.



Выяснение функциональных особенностей каждого гена, его белковых продуктов, идентификация генных сетей нормальных и патологических процессов, особенностей индивидуальной лекарственной чувствительности открывает широкие перспективы для фармакогеномики. Именно это сравнительно новое направление, по мнению ученых, будет определять дальнейшие пути развития лекарственной терапии и фармакологической промышленности. На его основе будут созданы сотни новых лекарств направленного действия для самых частых болезней, таких как диабет, гипертония, астма, психические болезни, различные раки. Знание молекулярных механизмов патологических процессов позволит эффективно разрабатывать фармацевтические препараты направленного действия, т.е. прерывающие патологическую цепочку в наиболее важном звене, и, таким образом, на самых ранних молекулярных этапах прекращать развитие болезни. В настоящее время активно создаются геномные наборы («киты») для проведения масштабных фармакогенетических исследований, а также ДНК-чипы и микропланшеты для ускоренной идентификации тех генов, продукты которых взаимодействуют с лекарственными препаратами (<http://www.pharmgkb.org>). Предполагают, что уже в близком будущем продукты многих генов придут на смену химическим лекарственным препаратам.

В качестве лекарств могут выступать и сами гены. Этим перспективным направлением (не представленным в данной книге из-за ограниченного объема) является *генная терапия*. Несмотря на разочарования последних лет и даже гибель одного пациента в результате, как считают, генной терапии, недавно появились ободряющие сообщения об успехах в генной терапии гемофилии В, некоторых иммунодефицитов и даже миодистрофии Дюшенна. Нет сомнения, что именно генной терапии принадлежит большое будущее не только в лечении моногенных болезней. Это теперь только вопрос времени.

Общепризнано, что рак — это болезнь генома соматических клеток. Доказано, что неопластическая трансформация затрагивает не единичные гены, а многие десятки, а скорее всего и сотни генов. Часть генов в опухолях более активна, чем в норме, другая часть — менее активна. Поэтому, чтобы вернуть клетку к норме, в идеале нужно бы сбалансировать активность очень многих генов. Очевидно, что путем индивидуальных воздействий на отдельно взятые гены такую сложную задачу вряд ли можно решить. Поэтому более перспективен путь генной терапии отдельных поврежденных генов, которые «командуют» другими генами (master-гены). Разрабатываются методы, которые позволяют их выявлять. Замена поврежденных «ключевых» генов на нормальные может привести к нормализации фенотипа клеток. Генотерапия рака теперь базируется на прочной геномной основе, чего никогда не было прежде. Поэтому здесь можно смотреть в будущее с обоснованным оптимизмом.

Полезно упомянуть еще об одном направлении молекулярной медицины, также являющимся следствием успехов в геномных исследованиях. Это *ДНК-иммунизация*. Старая и могучая наука — иммунология всегда базировалась на белках-антигенах, которые вызывают образование антител — иммунный ответ. Сейчас доказано, что иммунный ответ можно вызвать введением ДНК, которая, в свою очередь, играет роль антигена. Эта революция в иммунологии, безусловно, важна для создания невосприимчивости ко многим болезням, так как в этом слу-

чае белок-антиген в клетках образуется постоянно, а не разрушается после введения как при обычной иммунизации белками.

Несмотря на столь широкие и манящие горизонты современной геномики, основным препятствием на пути внедрения ее достижений в медицинскую науку и практику остается плохая информированность населения о достижениях генетики, отсутствие необходимых генетических знаний у практических врачей. У многих из них до сих пор сохраняется предубеждение против широкого внедрения генетики в медицину, в жизнь. Учебные программы неадекватно информируют студентов о современном состоянии науки. Между тем, достижения геномики станут очевидными и принесут реальную пользу только в том случае, если информация будет сочетаться в этой области с высоким профессионализмом врачей, опирающихся на четкие этические стандарты. Поэтому на современном этапе программа «Геном человека» обращает особое внимание на генетическое образование врачей. В настоящее время в Интернете можно найти целый набор программ и специальных книг, посвященных генетическому образованию врачей и студентов медицинских вузов (например, Continuing education in Genetics) ([www.ornl.gov/hgmis](http://www.ornl.gov/hgmis)).

Таким образом, расшифровка молекулярной структуры генома человека как впрочем, достижения всей современной геномики в целом — *«это не конец, это даже не начала конца, это только конец начала»*.

К сожалению, в нашей стране век геномики еще не наступил и наше общество в целом не готово к его приходу. Хочется надеяться, что данная монография — первое, но далеко не последнее обращение ведущих специалистов-генетиков к врачам и обществу, — будет воспринята широким кругом читателей. Возрождение программы «Геном человека» в России в новом качестве и с новыми задачами позволит устранить этот досадный пробел в отечественной науке.

## Литература

*Collins F.S., McKusick V.A.* Implications of the Human Genome Project for medical science // JAMA. 2001. Vol. 285. № 5. P. 540—544.

*Peltonen L., McCusick V.A.* Genomics and medicine. Dissecting human diseases in the postgenomis era // Science. 2001. Vol. 16. № 291(5507). P. 1224—1229.

# Список терминов и сокращений

- Аддитивный эффект (аддитивное действие генов)** — суммарное действие генов на проявление определенного признака или суммарное выражение однозначно действующих генов
- Аллель** — одно из двух (или нескольких) альтернативных структурных форм состояний гена, каждая из которых характеризуется уникальной последовательностью нуклеотидов
- Антигены** — белки или комплексы белков с низкомолекулярными соединениями, которые дают специфическую реакцию с соответствующими сыворотками
- Апоптоз** — программируемая гибель клетки
- Ассоциация** — (здесь) связь генетического маркера с заболеванием, более частая (положительная ассоциация) или более редкая (отрицательная ассоциация) встречаемость определенных аллелей или генотипов генетического маркера в группе больных по сравнению с контрольной группой
- «Бэнд»** — полоса, видимая в световом или люминесцентном микроскопе после окраски хромосом
- Гамета** — половая клетка
- Гаплоидный набор хромосом** — набор хромосом в гаметах, который равен половине диплоидного набора соматических клеток
- Гаплотип** — сочетание аллелей одного локуса, расположенных на одной хромосоме
- Ген** — элементарная единица наследственности, наименьший неделимый элемент наследственного материала, который может быть передан от родителей потомству как целое и который определяет признаки, свойства или физиологическую функцию организма. На молекулярном уровне — это участок молекулы ДНК, кодирующий первичную структуру белков и РНК
- Геномный импринтинг** — эпигенетический механизм регуляции экспрессии гомологичных генов в процессе развития организма в зависимости от родительского происхождения гена, хромосомы или генома
- Генотип** — сочетание аллелей нескольких локусов, расположенных на разных хромосомах

- Гетерозиготность** — наличие разных аллелей в соответствующих локусах в диплоидном наборе хромосом
- Гетероплазмия** — присутствие в клетках растущего организма сотен митохондрий как с мутантной, так и с нормальной ДНК
- Гомозиготность** — наличие одинаковых аллелей в соответствующих локусах в диплоидном наборе хромосом
- Гомоплазмия** — наличие клеточных популяций, в которых митохондриальный геном представлен почти исключительно мутантными или только нормальными копиями митохондриальной ДНК
- Диплоидный набор** — набор хромосом в соматических клетках организма, который содержит два гомологичных набора хромосом, из которых один передается от одного родителя, а второй — от другого
- Дискордантность** — несовпадение индивидов по наличию или отсутствию заболевания или любого другого признака, включая генетические
- Импринтированный ген** — ген, который дифференциально экспрессируется в зависимости от материнского или отцовского происхождения. Импринтированные гены в диплоидной клетке млекопитающих обычно экспрессируются только с одного аллеля
- Инtron** — фрагмент гена, разделяющий экзоны, удаляемый в процессе созревания пре-мРНК и, соответственно, отсутствующий в зрелой мРНК
- Конкордантность** — совпадение индивидов по наличию или отсутствию заболевания или любого другого признака, включая генетические
- Локус** — местоположение определенного гена (его аллелей) или генетического маркера на хромосоме
- Медианная сеть** — один из графических вариантов представления данных по полиморфизму ДНК, который позволяет проследить дивергенцию определенного участка хромосомы от предковой нуклеотидной последовательности
- Мейоз** — основное звено гаметогенеза (формирование половых клеток), в результате которого происходит уменьшение числа хромосом в два раза и клетки переходят из диплоидного состояния в гаплоидное
- Микросателлит** — tandemный повтор с изменяющимся числом повторяющихся единиц, каждая из которых имеет длину от 1 до 6 п.н
- Минисателлит** — tandemный повтор с изменяющимся числом повторяющихся единиц, каждая из которых имеет длину равную или больше 7 п.н. Другое название — VNTR
- Неравновесие по сцеплению** — неслучайное сочетание аллелей разных локусов в гаметах
- ОРД** — однородительская дисомия

<b>Ортологические области хромосом</b>	— в данном обзоре относится к областям хромосом человека и грызунов (мышь и крыса), имеющих сходную структурно-функциональную организацию. В этих областях гомологичные гены расположены в одинаковом или близком порядке
<b>ПААГ</b>	— полиакриламидный гель
<b>ПДРФ</b>	— полиморфизм длины рестрикционных фрагментов
<b>Пенетрантность гена</b>	— проявляемость гена
<b>Плейотропный эффект гена</b>	— многонаправленность действия гена; наряду с основной функцией ген оказывает дополнительное воздействие на ряд других процессов, проходящих в организме
<b>П.н., т.п.н. и м.п.н.</b>	— пары нуклеотидов, тысячи пар нуклеотидов и миллионы пар нуклеотидов ДНК
<b>Полиморфизм</b>	— многообразие нуклеотидных последовательностей, в том числе и аллельных форм гена. Полиморфным считается ген, имеющий два и более аллелей
<b>ПГ</b>	— потеря гетерозиготности
<b>ПИ</b>	— потеря импринтинга
<b>Пробанд</b>	— лицо, с которого начинается семейное исследование
<b>РДМ</b>	— район дифференциального метилирования
<b>Риск абсолютный (R)</b>	— характеризует вероятность развития заболевания у носителей данного маркера, аллеля или комбинации аллелей
<b>Риск относительный (OR)</b>	— показывает, во сколько раз риск развития заболевания выше у носителей данного маркера, аллеля или комбинации аллелей по сравнению с лицами, не имеющими данного генетического маркера, аллеля или комбинации аллелей
<b>СА</b>	— синдром Ангельмана
<b>СВБ</b>	— синдром Видемана—Беквита
<b>СПВ</b>	— синдром Прадера—Вилли
<b>Сибсы</b>	— общее наименование для братьев и сестер
<b>Хромосома</b>	— составной элемент клеточного ядра, являющийся носителем генов. В основе хромосомы лежит линейная молекула ДНК
<b>ЦИ</b>	— центр импринтинга
<b>Экзон</b>	— фрагмент гена, кодирующий аминокислотную последовательность и остающийся в зрелой мРНК после транскрипции и удаления интронов при созревании пре-мРНК
<b>Экспрессия гена</b>	— наличие синтеза РНК (рибосомные и транспортные РНК) или мРНК (информационная РНК), а затем и белкового продукта в определенных типах клеток организма
<b>Эпигенетическая регуляция</b>	— наследственные и ненаследственные изменения в экспрессии конкретного гена без структурных изменений в его нуклеотидной последовательности

- Эпигенотип (импринт)** — совокупность модификаций, которые по-разному маркируют родительские аллели и обеспечивают моноаллельный характер экспрессии импринтированных генов на хромосомах отцовского или материнского происхождения
- Этиологическая мутация (вариант)** — определенный аллель конкретного гена, сцепленного с заболеванием. Часто этот аллель широко распространен в популяции, при этом сам по себе он не приводит к развитию заболевания. Однако наличие определенной комбинации этиологических вариантов в генах, предрасполагающих к заболеванию, может приводить к физиологическим нарушениям, находящим свое выражение в развитии заболевания
- Ядерные семьи** — полные семьи с обоими живыми родителями и двумя или более больными сибсами
- BAC** — бактериальная искусственная хромосома
- ETDT** — расширенный метод TDT. Позволяет анализировать сцепление с заболеванием с помощью не только биаллельных маркеров, но и полиморфных маркеров с большим количеством аллелей
- Lod** — логарифм величины, показывающей соотношение шансов (правдоподобия) за и против сцепления (logarithm of odds ratio)
- $\lambda_s$  — уровень семейной ассоциации с СД типа 1 (degree of familial clustering of type 1 DM).  $\lambda_s = R_{\text{сисба}} / R_{\text{популяции}}$  (6% / 0,04% = 15)
- MLS** — логарифм величины, показывающей, во сколько раз выше вероятность того, что данный маркер сцеплен с заболеванием (maximum lod score)
- MMLS** — многоточечный MLS
- PAC** — фаговая искусственная хромосома
- SSCP** — одноцепочечный конформационный полиморфизм
- STS** — участок ДНК с известной нуклеотидной последовательностью, для которого также установлено положение на хромосоме (sequence tagged site)
- TDT** — метод анализа сцепления биаллельного маркера с заболеванием. Основан на неравной вероятности передачи аллелей больному ребенку от родителей, гетерозиготных по данному маркеру, в том случае, когда используемый локус и гипотетический локус, определяющий развитие заболевания, сцеплены или находятся в неравновесии по сцеплению (transmission disequilibrium test)
- Tsp** — метод анализа ассоциации полиморфного маркера с заболеванием при наличии сцепления в этой области
- VNTR** — см. минисателлит
- YAC** — искусственная хромосома дрожжей

# Сведения об авторах

Асеев Михаил Владимирович, ГУ Научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии им. Д.Р. Отта РАМН, 199034 Санкт-Петербург, Менделеевская линия, 3, baranov@vb2475.spb.edu

Бабенко Ольга Владимировна, ГУ Медико-генетический научный центр РАМН, 115478 Москва, ул. Москворечье, д. 1, zalnem@online.ru

Баранов Владислав Сергеевич, ГУ Научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии РАМН, 199034 Санкт-Петербург, Менделеевская линия, 3, baranov@vb2475.spb.edu

Баранова Елена Владиславовна, ГУ НИИ акушерства и гинекологии РАМН

Васильев Вадим Борисович, Институт экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, ул. акад. Павлова, д. 12

Гайнер Татьяна Александровна, Государственный Новосибирский областной клинический диагностический центр, ул. Залесского 6, корп. 7, 630047 Новосибирск, nrdc@ganch.ru

Горбунова Виктория Николаевна, Институт педиатрии РАМН, Санкт-Петербург

Залетаев Дмитрий Владимирович, НИИ молекулярной медицины ММА им. И.М. Сеченова МЗ РФ, 119992, ул. Б. Пироговская, д. 2/6, zalnem@online.ru

Иванов Владимир Ильич, Медико-генетический центр РАМН, 115478 Москва, ул. Москворечье, 1, viimgnc@corbina.ru

Ивашенко Татьяна Эдуардовна, ГУ Научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта РАМН, 199034 Санкт-Петербург, Менделеевская линия, 3, baranov@vb2475.spb.edu

Ижевская Вера Леонидовна, Медико-генетический центр РАМН, 115478 Москва, ул. Москворечье, 1, viimgnc@corbina.ru

Карамышева Татьяна Витальевна, Институт цитологии и генетики СО РАН, пр. акад. Лаврентьева 10, 630090 Новосибирск, kary@bionet.nsc.ru

Киселев Лев Львович, Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991 Москва, Вавилова, 32, kissel@cimb.relam.ru

Лимборская Светлана Андреевна, Институт молекулярной генетики РАН, 123182 Москва, пл. Курчатова, 46, slomin@img.ras.ru

Немцова Марина Вячеславовна, Медико-генетический центр РАМН, 115478 Москва, ул. Москворечье, 1, zalnem@glas.apc.org

Носиков Валерий Вячеславович, ГосНИИГенетика, 113545 Москва, 1-й Дорожный проезд, 1, nosikov@genetika.ru

Пузырев Валерий Павлович, НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН, 63450 Томск, набережная р. Ушайки, 10, valery@img.tsu.ru

Рубцов Николай Борисович, Институт цитологии и генетики СО РАН, пр. акад. Лаврентьева, 10, 630090 Новосибирск, RUBT@bionet.nsc.ru

Степанов Вадим Анатольевич, НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН, 634050 Томск, набережная р. Ушайки, 10, vadimst@img.tsu.ru

Стрельников Владимир Викторович, Медико-генетический центр РАМН, 115478 Москва, ул. Москворечье, 1

Фрейдин Михаил Борисович, НИИ медико-генетического Томского научного центра Сибирского отд. РАМН

Хуснутдинова Эльза Камилевна, Институт биохимии и УНЦ РАН, 450054 Уфа, пр. Октябрия, 69, ekkh@anrb.ru

# Оглавление

<b>Геном человека и молекулярная медицина. Краткое введение</b> ( <i>В.С. Баранов, Л.Л. Киселев</i> )	3
<b>Глава 1. Стратегия идентификации генов наследственных болезней человека</b>	14
1.1. Моногенные заболевания ( <i>В.С. Баранов, В.Н. Горбунова</i> )	14
1.2. Мультифакториальные заболевания ( <i>В.П. Пузырев, В.А. Степанов</i> )	27
<b>Глава 2. Мутации. Классификация, номенклатура, механизмы возникновения, методы диагностики</b> ( <i>В.С. Баранов, Т.Э. Иващенко</i> )	40
2.1. Некоторые общие представления. Мутации и полиморфизмы	40
2.2. Классификация мутаций, механизмы их возникновения	43
2.3. Номенклатура мутаций	45
2.4. Мутации и наследственные болезни	47
2.5. Идентификация мутаций	50
<b>Глава 3. Молекулярные основы наследственных заболеваний</b>	74
3.1. Молекулярные основы наиболее частых моногенных болезней ( <i>В.С. Баранов, Т.Э. Иващенко, М.В. Асеев</i> )	74
3.2. Молекулярные основы распространенных мультифакториальных заболеваний ( <i>В.П. Пузырев, В.А. Степанов, М.И. Фрейдлин</i> )	100
3.3. Митохондриальные болезни ( <i>В.Б. Васильев</i> )	137
<b>Глава 4. Молекулярные механизмы этиопатогенеза болезней экспансии повторяющихся последовательностей</b> ( <i>В.В. Стрельников, Д.В. Залетаев</i> )	150
4.1. Болезни экспансии некодирующих повторов	150
4.2. Болезни экспансии кодирующих повторов	157
4.3. ДНК-диагностика болезней экспансии	172
<b>Глава 5. Геномный импринтинг и наследственная патология у человека</b> ( <i>М.В. Немцова, Д.В. Залетаев</i> )	179
5.1. Общие представления об импринтинге	179
5.2. Метилирование ДНК как эпигенетическая метка	183
5.3. Синдромы Прадера–Вилли и Ангельмана как модель изучения патологии импринтинга	184
5.4. Молекулярная организация хромосомного района 15 (q11-q113)	185



5.5.	Формы молекулярной патологии, вызывающие синдромы Прадера—Вилли и Ангельмана . . . . .	186
5.6.	ДНК-диагностика синдромов Прадера—Вилли и Ангельмана . . . . .	200
5.7.	Синдром Видеманна—Беквита и вторая модель импринтинга . . . . .	204
5.8.	Механизмы геномного импринтинга . . . . .	211
<i>Глава 6.</i>	<b>Современные методы молекулярно-цитогенетического анализа и диагностика хромосомных патологий (Н.Б. Рубцов, Т.В. Карамышева, Т.В. Гайнер)</b> . . . . .	219
6.1.	Хромосомный анализ в диагностике наследственных и врожденных хромосомных патологий и онкологических заболеваний . . . . .	220
6.2.	Основные принципы гибридизации нуклеиновых кислот <i>in situ</i> . . . . .	222
6.3.	Основные направления развития методов молекулярно-цитогенетической диагностики хромосомных аномалий . . . . .	224
6.4.	Практика молекулярно-цитогенетической диагностики в Российской Федерации . . . . .	235
<i>Глава 7.</i>	<b>Онкогеномика и молекулярная диагностика в онкологии (Д.В. Залетаев, В.Н. Горбунова, О.В. Бабенко)</b> . . . . .	245
7.1.	Молекулярные механизмы канцерогенеза . . . . .	246
7.2.	Эпигенетическая регуляция экспрессии генов в опухоли . . . . .	258
7.3.	ДНК-диагностика в онкологии . . . . .	267
<i>Глава 8.</i>	<b>Генетика сахарного диабета типа 1 (В.В. Носиков)</b> . . . . .	281
8.1.	Тип наследования при сахарном диабете типа 1 . . . . .	281
8.2.	Молекулярно-генетические маркеры сахарного диабета типа 1 . . . . .	282
8.3.	В чем причины того, что нельзя сделать однозначных выводов о наличии сцепления генов с СД типа 1? . . . . .	305
8.4.	Заключение и стратегия будущих исследований . . . . .	306
<i>Глава 9.</i>	<b>Этногеномика (Э.К. Хуснутдинова, С.А. Лимборская)</b> . . . . .	312
9.1.	Полиморфизм ДНК и его использование для изучения истории и происхождения народов . . . . .	312
9.2.	Аутосомные маркеры ДНК . . . . .	319
9.3.	Полиморфизм митохондриальной ДНК человека . . . . .	330
9.4.	Полиморфизм ДНК Y-хромосомы . . . . .	336
<i>Глава 10.</i>	<b>Геномика и этика (В.И. Иванов, В.Л. Ижевская)</b> . . . . .	349
<i>Глава 11.</i>	<b>Геном человека как научная основа предиктивной медицины (В.С. Баранов, Е.В. Баранова, Т.Э. Иващенко)</b> . . . . .	361
11.1.	Геном человека и молекулярная медицина . . . . .	361
11.2.	Генетический полиморфизм и гены предрасположенности . . . . .	362
11.3.	Болезни, доступные для генетического тестирования . . . . .	368
11.4.	Генетическая карта (генетический паспорт) . . . . .	373
11.5.	Интерпретация результатов генетического тестирования . . . . .	376
	<b>Геномика — медицина. Заключение (В.С. Баранов, Л.Л. Киселев)</b> . . . . .	380
	<b>Список терминов и сокращений</b> . . . . .	386
	<b>Сведения об авторах</b> . . . . .	390

ISBN 5-94628-212-3



9 785946 282123

