

А. А. Сазанов ОСНОВЫ ГЕНЕТИКИ

А. А. Сазанов

ОСНОВЫ ГЕНЕТИКИ



УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ

Автономное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
ЛЕНИНГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени А. С. ПУШКИНА

А. А. Сазанов

ОСНОВЫ ГЕНЕТИКИ

*Рекомендуется государственным образовательным
учреждением высшего профессионального образования
«Московский педагогический государственный университет»
в качестве учебного пособия для студентов высших
учебных заведений, обучающихся по направлению 050700.62
«Специальное (дефектологическое) образование».*
Регистрационный номер рецензии 255 от 30 июня 2011 г.

Санкт-Петербург
2012

УДК 575 (075.8) + 577.21 (075.8)
ББК 28.04я73 + 28.041.10я73

Сазанов А. А.

Основы генетики: учеб. пособие / А.А. Сазанов. – СПб.: ЛГУ им. А.С. Пушкина, 2012. – 240 с.
ISBN 978-5-8290-1132-1

В учебном пособии раскрываются основные положения классической и молекулярной генетики в применении к наследственным заболеваниям и генетическим особенностям человека. Существенное внимание уделено анализу родословных, прогнозированию генетического риска, использованию геномных баз данных, современным методам молекулярной и цитогенетической диагностики. Феноменологическое описание наследственных патологических состояний сочетается с раскрытием их генетической природы на хромосомном и молекулярном уровнях. В отдельном разделе рассмотрены наследственные нарушения умственного и физического развития.

Издание предназначено в первую очередь для студентов-дефектологов. Книга может представлять практический интерес для будущих медиков, психологов, а также специалистов в области коррекционной педагогики и специальной психологии.

*Печатается по решению редакционно-издательского совета
Ленинградского государственного университета имени А. С. Пушкина*

ISBN 978-5-8290-1132-1

© Ленинградский государственный
университет (ЛГУ)
имени А. С. Пушкина, 2012
© Сазанов А.А., 2012

Оглавление

Предисловие	6
Список сокращений	8
Глава 1. Предмет, краткая история и основные положения генетики	9
Глава 2. Классический генетический анализ	15
2.1. Моногенные различия	15
2.2. Типы взаимодействия аллелей	17
2.3. Генеалогический метод	19
2.4. Типы наследования	21
2.5. Полигенные различия	27
2.6. Взаимодействие генов	28
2.7. Сцепленное наследование	32
Глава 3. Основы популяционной генетики	40
Глава 4. Близнецовый метод	44
Глава 5. Цитогенетика человека	46
5.1. Внутриклеточные носители наследственной информации у человека – ядро и митохондрии.....	46
5.2. Митоз, мейоз и особенности созревания половых клеток человека	50
5.3. Структурно-функциональная организация хромосом	57
5.4. Дифференциальное окрашивание и блочная организация хромосом	61
5.5. Гибридизация <i>in situ</i> , хромосомный пейнтинг и сравнительная геномная гибридизация (CGH)	68
5.6. Теория старения в связи с динамикой структуры теломеры	74
5.7. Нормальный кариотип человека	75
5.8. Аномалии числа хромосом	78
5.9. Внутрихромосомные перестройки	86

Глава 6. Нуклеиновые кислоты	105
6.1. Структура ДНК и РНК	105
6.2. Репликация ДНК.....	110
6.3. Транскрипция	112
6.4. Процессинг РНК	113
6.5. Трансляция.....	114
6.6. Рекомбинация	116
6.7. Репарация ДНК	117
6.8. Генная конверсия.....	118
6.9. Подвижные элементы генома	119
6.10. Генные мутации	120
Глава 7. Основы молекулярной генетики	125
7.1. Геномика, транскриптомика, протеомика	125
7.2. Клонирование нуклеиновых кислот	129
7.3. Гибридизация нуклеиновых кислот	129
7.4. Геномные библиотеки	130
7.5. Полимеразная цепная реакция (ПЦР).....	135
7.6. Секвенирование ДНК.....	140
7.7. Сборка сиквенсов геномов.....	142
7.8. Биоинформатика и системная биология	144
Глава 8. Молекулярная организация генома человека	146
8.1. Повторяющиеся и уникальные последовательности ДНК.....	146
8.2. Композиционная гетерогенность.....	151
8.3. Ортология и паралогия	158
8.4. Геномные базы данных.....	163

Глава 9. Наследственные болезни человека	169
9.1. Понятие, классификация и особенности наследственной патологии	169
9.2. Хромосомные болезни	171
9.3. Генные болезни	171
9.4. Молекулярные маркеры в изучении наследственной патологии	184
Глава 10. Цитогенетическая и молекулярно-генетическая диагностика наследственных заболеваний человека	188
10.1. Диагностика хромосомных болезней	188
10.2. Диагностика гетерозиготного носительства и определение генетического риска моногенных заболеваний	190
Глава 11. Наследственные нарушения умственного и физического развития	193
11.1. Роль генетических факторов в возникновении расстройств речи	193
11.2. Наследственные формы интеллектуальных нарушений	195
11.3. Генетика эмоционально-личностных расстройств и девиантного поведения	204
11.4. Наследственные формы нарушений опорно-двигательного аппарата	206
11.5. Наследственные формы глухоты и тугоухости в детском возрасте	212
11.6. Генетически обусловленные формы детской слепоты и слабовидения	218
Глава 12. Современные подходы к лечению и профилактике наследственных заболеваний	226
12.1. Принципы генотерапии	226
12.2. Медико-генетическое консультирование	228
Предметный указатель	230

Предисловие

Предметом генетики являются наследственность и изменчивость – наиболее общие свойства живых организмов. Концептуальный характер генетики позволяет считать ее точной наукой наряду с математикой, физикой и химией. Таким образом, связывая биологию с другими естественнонаучными дисциплинами, генетика дает возможность формировать у студентов научное мышление на основе анализа и синтеза. Освоение логики генетического анализа содействует развитию дисциплины научного мышления. Прикладное значение генетики стремительно возрастает, что настоятельно требует качественного повышения уровня генетического образования.

Для студентов-дефектологов особое значение имеет понимание общих принципов наследственной патологии, закономерностей развития и протекания наследственных заболеваний, знание методов диагностики и прогнозирования генетического риска, умение прочесть и понять цитогенетический диагноз. Особенности наследования заболеваний и предрасположенности к заболеваниям опорно-двигательного аппарата, эмоционально-личностных расстройств и девиантного поведения, глухоты и тугоухости, слепоты и слабовидения, расстройств речи также имеют существенное значение как в общеобразовательной, так и в практической подготовке педагогов-дефектологов.

Знакомство с классическим генетическим анализом и классическими цитогенетическими методами позволит получить глубокое представление о природе наследственности и путях ее изучения. Знание современных положений геномики, транскриптомики, протеомики и системной биологии открывает перед учащимися возможность постоянно расширять и пополнять сведения о наследственных заболеваниях как с помощью спе-

циальной научной литературы, так и из ресурсов геномных баз данных, размещенных в сети Интернет.

Особое внимание в книге уделено составлению и анализу родословных, поскольку генеалогический метод лежит в основе генетического анализа у человека и служит как для понимания наследственной природы многих заболеваний, так и для прогнозирования генетического риска.

В последнее время все чаще практикуется совместное обучение детей с наследственными аномалиями и здоровых детей. Поэтому знание основ наследственной патологии человека будет полезным не только для дефектологов, но и для всех педагогов.

Студенты-биологи и студенты-медики, а также специалисты в данных областях смогут найти в книге систематизированные данные по наследственной патологии человека вообще и по влиянию наследственных факторов на различные формы нарушений развития у детей и подростков, в частности.

Автор искренне благодарен Анне Львовне Сазановой, оказавшей бесценную помощь при сборе материала, составлении иллюстраций и подготовке рукописи к печати.

Автор посвящает книгу светлой памяти своих родителей – Людмилы Николаевны и Александра Алексеевича.

Список сокращений

АТ	– пара нуклеотидов аденин-тимин
ГЦ	– пара нуклеотидов гуанин-цитозин
кДНК	– комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота
мРНК	– матричная рибонуклеиновая кислота
пг	– пикограмм
п.н.	– пара нуклеотидов
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
т.п.н.	– тысяча пар нуклеотидов
сМ	– сантиморган
ЯОР	– район ядрышкового организатора
ВАС	– искусственная бактериальная хромосома
CGH	– сравнительная геномная гибридизация
EST	– экспрессирующаяся нуклеотидная последовательность
FISH	– флуоресцентная гибридизация ДНК-ДНК <i>in situ</i>
FLpter	– фракционное расстояния от теломера короткого плеча хромосомы (выражается в долях единицы)
GTG	– G-окраска при помощи трипсина и красителя Романовского-Гимзы
HSA	– хромосома человека
ORF	– открытая рамка считывания
SNP	– сайт мононуклеотидного полиморфизма

Глава 1. Предмет, краткая история и основные положения генетики

Генетика – это комплекс наук о свойствах живых организмов передавать свои признаки в ряду поколений (наследственность) и изменять свои признаки в силу различных причин (изменчивость).

Указанные выше свойства живых организмов привлекали внимание людей в течение тысячелетий. Однако до открытия законов Менделя все они имели умозрительных характер. Очевидный факт наследуемого сходства особей одного вида, родителей и потомков, братьев и сестер находил иногда мифологические интерпретации. Во многих сказках фигурируют гибриды человека и животных и самые трудновообразимые гибриды различных видов животных. Нелепые теории вроде «телегонии» (влияния предыдущих половых партнеров на признаки потомков) или «волновой генетики» (существования наследственных физических полей, независимых от структуры ДНК) из глубины веков дошли до нашего времени в псевдонаучных изданиях.

Теория прямого наследования, выдвинутая Гиппократом (460 до н. э. – 377 до н. э.), господствовала в научном и философском сознании долгое время. Согласно этой теории каждый орган, ткань, клетка влияет на формирование половых задатков, которые передаются потомкам. Болезнь или здоровье родителей непосредственно передаются детям. Ж.-Б. Ламарк (1744–1829) – создатель одной из первых эволюционных теорий – в вопросах генетики следовал учению о прямом наследовании. Непосредственное влияние окружающей среды на органы, либо стимулирование организмов к упражнению органов вызывало, по его мнению, стойкие наследуемые изменения. По Ламарку, «благоприобретенные» признаки служили основой для возникновения более совершенных существ. Основные положения ламаркизма – влияние среды на наследственность, превращения видов, отрицание роли естественного отбора – стали постулатами «мичуринской биологии» в СССР в

1930–1960 гг. Отдельные сторонники неоламаркизма встречаются до сих пор, несмотря на очевидность вреда от господства этого направления в биологии – уничтожения наиболее прогрессивных генетических школ в СССР и отставания от развитых стран в области биотехнологии, фармакологии, медицины и сельского хозяйства более чем на 50 лет.

Интересно, что Ч. Дарвин (1809–1882) придерживался в общем-то ламаркистских взглядов на наследственность. Он верил, что в крови циркулируют «геммулы» (гипотетические частицы генетической информации), которые собирают сведения о состоянии органов и систем и несут ее в половые клетки, затем после оплодотворения из них развиваются клетки нового организма. Несмотря на то, что эта теория была опровергнута уже современниками Дарвина, до сих пор в языке присутствуют анахроничные понятия «кровность», «кровные родственники», «полукровки» и т. д., отражающие стойкость человеческих заблуждений о связи наследственности с кровью.

Аристотель (384 до н. э. – 322 до н. э.) позволил себе усомниться в господствовавшей теории прямого наследования и предположить, что половые продукты образуются независимо от органов тела. Развитие эта идея получила в трудах немецкого зоолога А. Вейсмана (1834–1914), который экспериментально показал ненаследуемость механических повреждений. Он писал: «Как же могут сообщаться зародышевой клетке, лежащей внутри тела, изменения, произошедшие в мускуле благодаря его упражнению, или уменьшение, испытанное органом от неупотребления, и притом ещё сообщаться так, чтобы впоследствии, когда эта клетка вырастет в новый организм, она на соответствующем мускуле и на соответствующей части тела из самой себя произвела те же самые изменения, какие возникли у родителей в результате употребления или неупотребления? Вот вопрос, который встал передо мной уже давно и который, по дальнейшем его обдумывании, привел меня к полному отрицанию такой наследственной передачи приобретенных свойств». Этой идее суждено было принести плод в форме современных представлений о наследственности и изменчивости.

Настоятель монастыря в Моравии Г.И. Мендель (1822–1884) будучи естествоиспытателем-любителем в свободное от работы время ставил опыты над горохом. Систематичность и упорядоченность этих опытов позволили ему найти наиболее фундаментальные принципы наследования признаков. Он руководствовался следующими соображениями:

- изучаемые признаки должны быть дискретны, т. е. без оттенков – либо есть либо нет, либо белый либо красный;
- признаки должны быть константны, т. е. неизменны в ряду поколений (Мендель проводил проверку в течение двух лет);
- в эксперименте должны использоваться родительские формы, различающиеся только по одному признаку;
- необходимо учитывать всех потомков от скрещивания дабы исключить влияние случайных событий.

Крупная научная удача Менделя состояла в том, что выбранные им семь признаков определялись генами на разных хромосомах, что исключало возможное сцепленное наследование. Он обнаружил, что:

- у гибридов первого поколения присутствует признак только одной родительской формы, а другой «исчезает». Это *закон единообразия гибридов* первого поколения;
- во втором поколении наблюдается расщепление: три четверти потомков имеют признак гибридов первого поколения, а четверть – «исчезнувший» в первом поколении признак. Это *закон расщепления*.
- каждая пара признаков наследуется независимо от другой пары. Это *закон независимого наследования*.

Разумеется, Мендель не знал, что эти положения со временем назовут *первым, вторым и третьим законами Менделя*. На этом научное везение великого генетика закончилось, последующие опыты на *Hieracium* (ястребинке) не увенчались успехом из-за незнания биологии объекта. Современники-профессионалы дружно проигнорировали монаха-самоучку, и естественным наукам оставалось только накапливать экспериментальный материал, ожидая второго открытия законов Менделя через 37 лет после первой публикации.

Начало XX столетия стало рубежом развития генетики – законы Менделя были переоткрыты в 1900 г. Г. Де Фризом, К. Корренсом и Э. Чермаком на растениях, а в 1902 г. У. Бэтсон и Е.Р. Саундерс подтвердили справедливость этих законов для животных в опытах на домашней курице. Немного позднее У. Бэтсон дополнил законы Менделя правилом чистоты гамет – каждая половая клетка (гамета) несет только один аллель из пары, присутствующей у диплоидной родительской особи. Им же было предложено название науки о наследственности и изменчивости – *генетика*.

Понятия «ген» (элементарный наследственный фактор), «генотип» (совокупность генов организма), «фенотип» (совокупность признаков организма) введены В. Иогансеном (1857–1927). Он же предложил термин «чистая линия» для организмов с практически одинаковым генотипом, полученных путем близкородственного скрещивания (инбридинга).

Явление сцепления – совместного ассоциированного наследования признаков, определяемых двумя или несколькими генами, – было открыто У. Бэтсоном и Р. Пеннетом в 1906 г. Было также известно о связи наследования некоторых признаков с полом. Эти наблюдения стали основой для создания группой Т. Моргана, в которую входили А. Стертевант, К. Бриджес и Г. Меллер, хромосомной теории в 1910 г. Они проводили исследования на плодовой мушке дрозофиле (*Drosophila melanogaster*) – небольшом насекомом (2–3 мм) с удивительным разнообразием наследуемых признаков, малым числом хромосом (всего четыре пары) и возможностью отбора девственных самок. Другим подарком научной фортуны стало наличие политенных хромосом в некоторых тканях двукрылых насекомых, к которым относится дрозофила, отличающихся от обычных митотических хромосом на несколько порядков по длине и имеющих поперечную исчерченность, которая позволяет проводить тонкое картирование (определение местоположения) генов. Все это позволило сформулировать хромосомную теорию:

- гены находятся в хромосомах и расположены линейно;
- полученные от каждого из родителей гомологичные хромосомы содержат парные аллели каждого гена;

- сцепление зависит от расстояния между генами и измеряется в сантиморганах – процентах рекомбинантных (имеющих сочетание аллелей, отличное от обеих родительских форм) особей;

- гены, расположенные в одной хромосоме, образуют группу сцепления и наследуются совместно при условии, что расстояние между ними менее 50 сантиморганов.

Молекулярная эра развития генетики началась в 1944 г., когда группой американских исследователей было показано, что для превращения непатогенного штамма пневмококков в патогенный (отличающийся наличием полисахаридной капсулы, которая позволяет закрепляться на тканях высших организмов), иными словами, для генетической трансформации, достаточно обработки первого штамма ДНК, выделенной из второго штамма. Супруги Ледерберг и Н. Циндер в начале 1950-х гг. выделили ДНК вирус кишечной палочки (бактериофаг лямбда) и описали явление трансдукции – переноса генов из одной бактерии в другую при помощи вирусов. Открытие явлений трансформации и трансдукции стало основанием для признания ДНК носителем генетической информации. В 1945 г. Дж. Бидлом и Э. Татумом было сформулировано положение «один ген – один фермент», которое после открытия доменной организации белков было исправлено на «один ген – один полипептид».

Структура ДНК была расшифрована Дж. Уотсоном и Ф. Криком, что наряду с данными, полученными М. Ниренбергом (он синтезировал полиурациловую РНК и показал, что с нее считывается только фенилаланин) и С. Очоа (впервые провел синтез РНК с различным составом азотистых оснований и расшифровал коды для 11-ти аминокислот), дало возможность сформулировать следующие свойства генетического кода:

- каждая аминокислота в составе белка кодируется тремя азотистыми основаниями (триплетом);
- триплеты не перекрываются;
- считывание начинается со стартового триплета, знаки препинания в ДНК отсутствуют;
- одной аминокислоте может соответствовать один и более одного триплета (генетический код является вырожденным).

Центральная догма молекулярной биологии, гласящая о том, что наследственная информация передается от нуклеиновых кислот к белку, но не в обратном направлении, была сформулирована группой исследователей под руководством Ф. Крика в 1961 г.

Первый искусственный ген был синтезирован группой Х.Г. Кхорана в 1969 г. Примерно в это же время развивается генная инженерия – совокупность методов изменения нуклеиновых кислот в живых организмах. Техника рекомбинантной ДНК (объединенной из двух или более источников) позволила провести клонирование (получение большого числа идентичных копий) многих генов различных организмов, убедиться в универсальности генетического кода, изучить молекулярно-генетические механизмы физиологических процессов и патологических состояний.

Следующий этап развития генетики – «постгеномная эра» – начался в 2003 г. после выхода первого релиза полной последовательности ДНК (сиквенса) генома человека. Хотя некоторые участки генома, в первую очередь прицентромерные районы хромосом, которые содержат препятствующие клонированию повторы, остаются до сих пор непрочитанными (данные на 2010 г.), комплекс данных полного сиквенса позволил создать геномные базы данных, что перевело исследования по генетике на качественно новый уровень. Вместо разрозненных сведений в отдельных экспериментальных статьях появился комплекс систематизированных данных по структуре нуклеиновых кислот, соответствующим им белковым продуктам, связанным с ними физиологическими особенностям и заболеваниями, месту и времени экспрессии, взаимном расположении, выявленных мутациях и о многих других существенно важных биологических особенностях. Секвенирование геномов других организмов позволило применять сравнительный подход для поиска и характеристики наследственных патологических состояний и физиологических особенностей.

Контрольные вопросы и задания

1. Сформулируйте основное различие между концепциями прямого и непрямого наследования.
2. Изложите законы Менделя и раскройте их содержание.
3. В чем состоят основные положения хромосомной теории?
4. Сохраняет ли центральная догма молекулярной биологии значение в настоящее время?

Глава 2. Классический генетический анализ

Генетический анализ – это система наблюдений и опытов, которая ставит целью вскрытие генотипической структуры особи, популяции или вида. Классическими методами генетического анализа считаются генеалогический – анализ родословных – у человека и гибридологический – постановка скрещиваний – у всех остальных живых существ. Основанием для проведения генетического анализа является установление факта наследования признака.

2.1. Моногенные различия

Вторым после установления факта наследования признака этапом генетического анализа является выяснение числа генов, определяющих альтернативное проявление признака. Для выяснения числа генов, вовлеченных в формирование признака, необходимо определить число фенотипических классов у гибридов первого поколения и зачастую у потомков возвратного скрещивания (т. е. скрещивания с одной из родительских форм). Гибридами считаются потомки скрещивания особей с разным генотипом. Скрещивание родительских форм, различающихся аллелями одного гена, называется моногибридным. Различия таких форм называются моногенными. Диплоидный организм (с двойным набором хромосом), в геноме которого присутствуют два одинаковых аллеля одного гена, называется гомозиготным. Гетерозиготным является диплоидный организм с разными аллелями одного гена. Гемизиготной называют диплоидную особь, имеющую только один из аллелей данного гена.

Родительские формы обозначаются латинской буквой P (от лат. *parento* – родители), гибриды – буквой F (*fillii* – дети). Гибриды первого поколения – F_1 , второго – F_2 и т. д. Гибриды, полученные от возвратного скрещивания, – F_b (от англ. *back-cross* – возвратное скрещивание). Если при возвратном скрещивании используется рецессивная родительская форма, такое скрещивание называется анализирующим, а его потомки обозначаются F_a (от англ. *analyse* – анализ). Женский пол обозна-

чается астрологическим знаком Венеры – ♀, а мужской – знаком Марса – ♂. Скрещивание обозначают знаком умножения – ×. Обычно первыми записывают особей женского пола, поскольку материнство всегда является установленным фактом, а отцовство имеет вероятностный характер. Например, P ♀ AA × ♂ Aa – скрещивание гомозиготной самки с гетерозиготным самцом. Мендель предложил записывать доминантных гомозигот двумя прописными буквами (AA), гетерозигот – одной прописной и одной строчной буквами (Aa), а гомозиготных рецессивов – двумя строчными буквами (aa). Для обозначения доминантного фенотипического класса, включающего доминантных гомозигот AA и гетерозигот Aa, используется обозначение A-. Понятно, что рецессивный фенотипический класс, включающий только гомозиготных рецессивов, обозначается aa.

Итак, по Менделю:

P ♀ AA × ♂ aa

F₁ Aa

F₂ 3 A- : 1 aa (1 AA : 2 Aa : 1 aa)

F_B 1 A- : 1 aa (1 Aa : 1 aa).

Следует обратить внимание, что в случае гибридов второго поколения (F₂) доминантный фенотипический класс A- представлен двумя генотипическими классами – AA и Aa – в соотношении 1 : 2, а в случае анализирующего скрещивания – только гетерозиготами Aa.

Таким образом, наличие расщепления 3 : 1 во втором поколении и 1 : 1 в анализирующем скрещивании однозначно указывает на моногенные различия родительских форм.

Аллель, наиболее часто встречающийся в популяции, называется аллелем дикого типа, а более редкие аллели – мутантными. Для аллелей дикого типа используют следующие обозначения: s⁺, w⁺.

Степень проявления признака у отдельных носителей определенного генотипа называется экспрессивность, а частота проявления признака среди носителей определенного генотипа – пенетрантность.

2.2. Типы взаимодействия аллелей

Существует пять типов взаимодействия аллелей – доминирование, неполное доминирование, кодоминирование, сверхдоминирование и межallelельная комплементация.

Классическим случаем взаимодействия аллелей, описанным Менделем, является доминирование. При этом у гибридов первого поколения проявляется признак только одной родительской формы, которая считается по этой причине доминантной (от лат. *dominatio* – господство). Признак родительской формы, «исчезающий» у гибридов первого поколения – рецессивный (от лат. *recessus* – отступление, удаление).

Пример

При скрещивании короткошерстных (LL) и длинношерстных (ll) кошек наблюдаем следующую картину:

P ♀ LL X ♂ ll

F₁ Ll (короткошерстные)

F₂ 3 L- : 1 ll (3 части короткошерстных и 1 часть длинношерстных)

F_B 1 L- : 1 ll (1 часть короткошерстных и 1 часть длинношерстных).

При неполном доминировании у гибридов первого поколения наблюдается проявление признака, промежуточное между двумя родительскими формами, а во втором поколении и у потомков анализирующего скрещивания расщепление по фенотипу полностью повторяет расщепление по генотипу:

P ♀ AA X ♂ aa

F₁ Aa

F₂ 1 AA : 2 Aa : 1 aa

F_B 1 Aa : 1 aa.

Пример

При скрещивании черных (BB) и белых (bb) кур получаем в F₁ голубых (андалузских) птиц. Во втором поколении – 1 часть черных, 2 части андалузских и 1 часть белых кур.

При кодоминировании два или более аллелей доминируют по отношению к рецессивному аллелю. Наиболее известный пример – наследование групп крови системы АВ0 у человека:

- I группа крови соответствует генотипу $I^0 I^0$;
- II группа крови – $I^A I^A$ или $I^A I^0$;
- III группа крови – $I^B I^B$ или $I^B I^0$;
- IV группа крови – только $I^A I^B$.

Биохимический механизм типов взаимодействия аллелей следующий:

- при полном доминировании проявление признака определяется присутствием одного из двух доминантных аллелей, каждый из которых кодирует полнофункциональный белок, необходимый для проявления признака;
- при неполном доминировании проявление признака является дозозависимым – половина количества функционального белка приводит к частичному проявлению признака;
- при кодоминировании две или более активные формы белка, кодируемые кодоминирующими аллелями, дают возможность проявиться соответствующему признаку независимо от наличия рецессивного аллеля.

Очень редко наблюдаются явления сверхдоминирования (когда гибриды первого поколения превосходят по степени проявления признака обе родительские формы) и межаллельной комплементации (когда у гибридов первого поколения появляется новый признак). Интересно, что биохимические механизмы сверхдоминирования и межаллельной комплементации близки – в обоих случаях аллели содержат мутации в участках, кодирующих разные домены белковых продуктов, которые являются функциональными аналогами. Объединение аллелей у гибридов первого поколения приводит к появлению продукта с новыми свойствами: большей степенью проявления признака (сверхдоминирование) или новой формой проявления признака (межаллельная комплементация).

Примеры:

- активность алкогольдегидрогеназы у гетерозиготных дрозофил выше, чем у обеих гомозиготных родительских форм;
- при скрещивании форм льна с белыми и розовыми цветками получаются растения с голубой окраской лепестков венчика.

Если присутствует серия множественных аллелей, то они последовательно проявляют по отношению друг к другу доминантность или рецессивность. Например, в локусе агути у собак присутствует следующая иерархия доминирования: $a^y > a^w > a^t > a$ (соболиный окрас шерсти > зонарный окрас > черно-подпалый окрас > черный окрас).

2.3. Генеалогический метод

Поскольку эксперименты на людях категорически неприемлемы, генетический анализ у человека традиционно был основан на использовании генеалогического метода, который позволяет систематизировать наблюдения путем составления и изучения родословных. Как правило, родословные составляют на основе опросов, хотя по мере развития медицинской статистики и увеличения охвата населения системой медико-генетического консультирования все большую роль в этом играют компьютерные базы данных.

Генеалогическое древо – родословная, которая выстраивается от индивидуума, с которого начато исследование – пробанда, и включает всех родственников по нисходящей линии. Пробандом необязательно является лицо, страдающее наследственным заболеванием, им может быть любой человек, обратившийся в медико-генетическую консультацию или просто участник опроса. Сибсами называются полнокровные братья и сестры, полусибсами – братья и сестры, имеющие одного общего родителя. На рис. 1, 2 и 3 представлены основные обозначения, которые рекомендованы для составления родословных. При этом следует отметить, что единых правил составления родословных не существует, и все обозначения должны быть отражены в легенде – списке использованных символов.

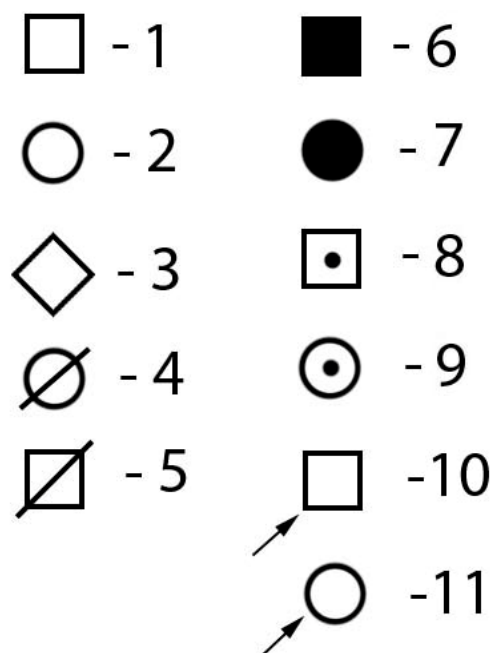


Рис. 1. Обозначения индивидуумов в родословных: 1 – мужчина, 2 – женщина, 3 – пол не определен, 4 – умершая женщина, 5 – умерший мужчина, 6 – мужчина – носитель признака, 7 – женщина – носитель признака, 8 – гетерозиготный мужчина, 9 – гетерозиготная женщина, 10 – мужчина-пробанд, 11 – женщина-пробанд

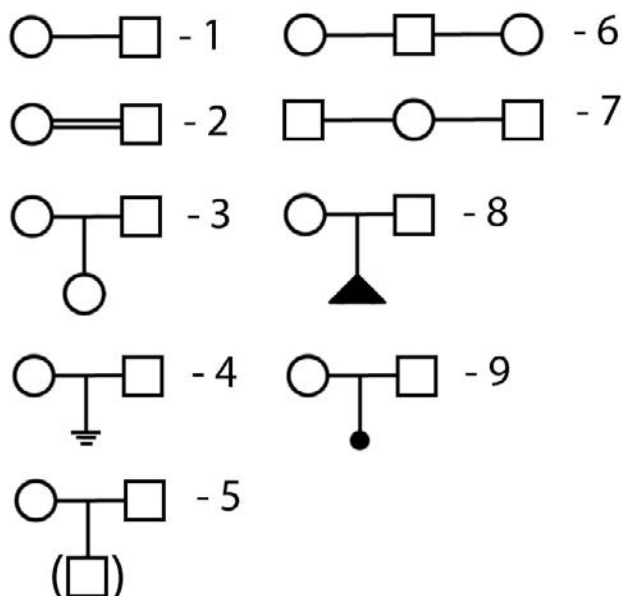


Рис. 2. Обозначения семей в родословных: 1 – брак (связь), 2 – кровнородственный брак, 3 – семья с одним ребенком – девочкой, 4 – бесплодный брак, 5 – семья с усыновленным ребенком – мальчиком, 6 – связь одного мужчины с двумя женщинами, 7 – связь одной женщины с двумя мужчинами, 8 – выкидыш, 9 – медицинский аборт

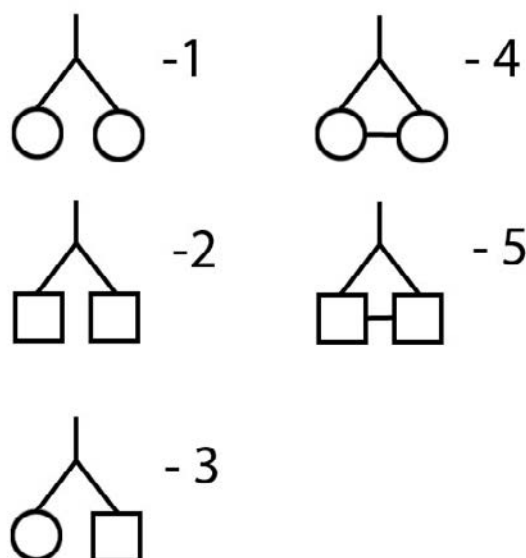


Рис. 3. Обозначения близнецов в родословных: 1 – разнаяйцовые (гетерозиготные) близнецы – девочки, 2 – разнаяйцовые (гетерозиготные) близнецы – мальчики, 3 – разнаяйцовые (гетерозиготные) близнецы – мальчик и девочка, 4 – однайцовые (монозиготные) близнецы – девочки, 5 – однайцовые (монозиготные) близнецы – мальчики

2.4. Типы наследования

Аутосомно-доминантный тип наследования признаков характеризуется проявлением признака во всех поколениях (без «проскока») и у обоих полов примерно с одинаковой частотой встречаемости (рис. 4). Ген, определяющий признак, находится в одной из 22 аутосом (т. е. тех хромосом, которые одинаковы у обоих полов), доминирование полное, мутантным является доминантный аллель, аллель дикого типа – рецессивный.

Примеры:

- свободная мочка уха по отношению к приросшей мочке;
- семейная гиперхолестеринемия;
- ахондроплазия.

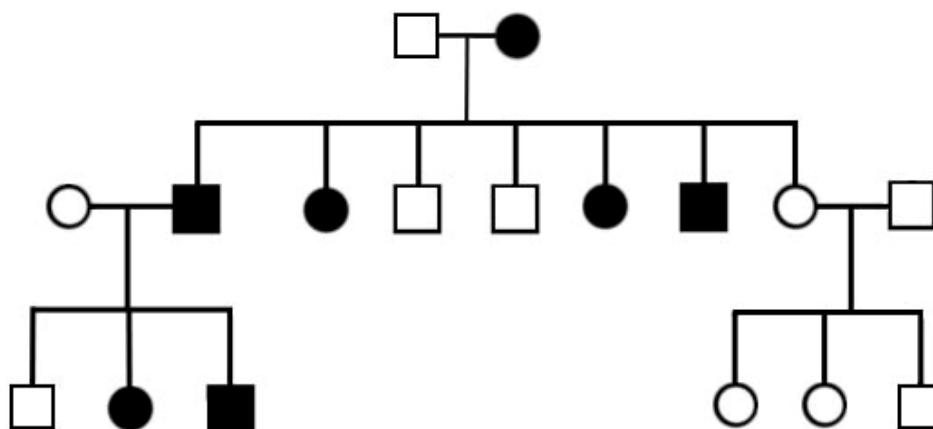


Рис. 4. Аутосомно-доминантный тип наследования

Аутосомно-рецессивный тип наследования признаков характеризуется проявлением признака у потомков родителей, которые не имели его – наблюдается «проскок поколений» (рис. 5). Представители обоих полов одинаково часто встречаются среди обладателей такого признака. Ген, определяющий признак, находится в одной из 22 аутосом, доминирование полное, мутантным является рецессивный аллель, аллель дикого типа – доминантный.

Примеры:

- муковисцедоз;
- фенилкетонурия;
- андро-генитальный синдром.

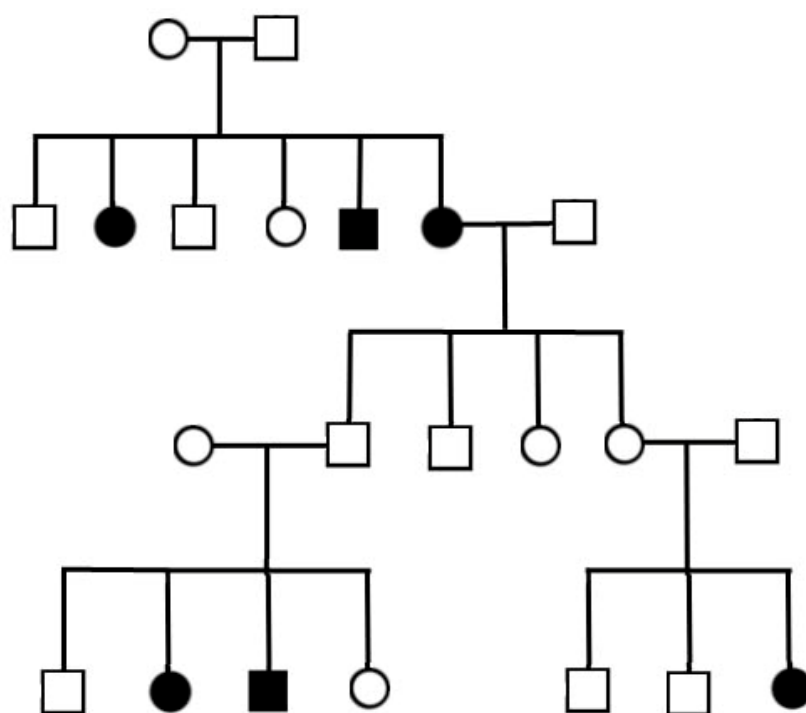


Рис. 5. Аутосомно-рецессивный тип наследования.
Виден «проскок» поколений

Сцепленное с полом доминантное наследование имеет сходство с аутосомно-доминантным – признак проявляется во всех поколениях, без «проскоков», но у женщин в два раза чаще, чем у мужчин (рис. 6). Однако в этом случае от отцов признак может передаваться только дочерям, а от матерей – с равной вероятностью сыновьям и дочерям. Степень проявления признака у гетерозиготных женщин, как правило, ниже, чем у гемизиготных мужчин, что во многом объясняется инактивацией одной из X-хромосом у женщин. Ген, определяющий признак, находится в половой X-хромосоме, доминирование полное, мутантным является доминантный аллель, аллель дикого типа – рецессивный.

Примеры:

- витамин-Д-резистентный рахит с гипофосфатемией;
- рото-лице-пальцевый синдром.

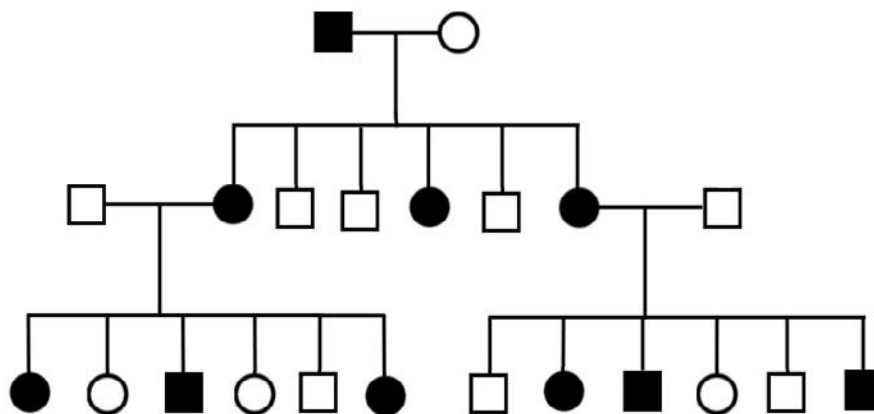


Рис. 6. Сцепленный с полом доминантный тип наследования

В случае сцепленного с полом рецессивного наследования, подобно аутосомно-рецессивному, могут появляться дети – обладатели признака у не имеющих этого признака родителей и часто наблюдается «проскок» поколений (рис. 7). Однако признак передается от отца к половине дочерей, если мать гетерозиготна (проявляется только в гомозиготном состоянии), и от гетерозиготной матери к половине сыновей (проявляется всегда, так как сыновья – гемизиготы). Никогда признак не передается от отца к сыну. Ген, определяющий признак, находится в половой X-хромосоме, доминирование полное, мутантным является рецессивный аллель, аллель дикого типа – доминантный.

Примеры:

- гемофилия А;
- синдром Леша-Нихена;
- дальтонизм.

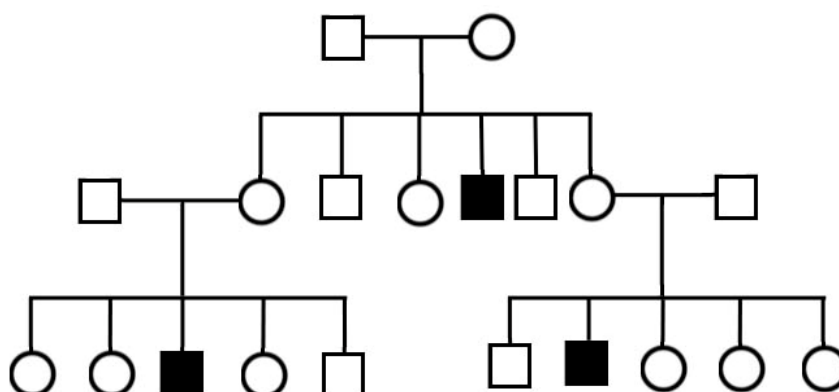


Рис. 7. Сцепленный с полом рецессивный тип наследования

Аутосомный, ограниченный полом тип наследования наблюдается в случаях аутосомной локализации гена, который его определяет, и физической возможности его проявления у особей только одного пола (процент белка в молоке или форма проявления вторичных половых признаков) (рис. 8). Этот тип наследования похож на сцепленное с полом рецессивное наследование. Главное отличие – при сцепленном с полом рецессивном наследовании признак никогда не передается от отца к сыну.

Пример

- моно- и билатеральный крипторхизм.

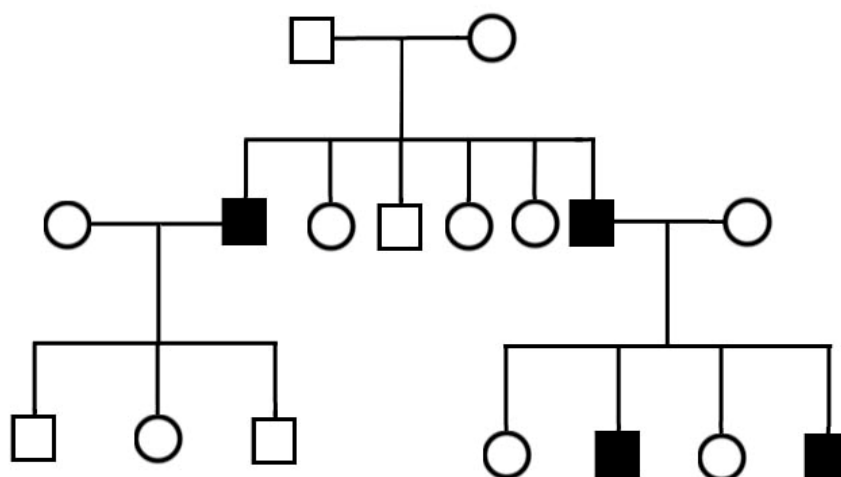


Рис. 8. Аутосомный, ограниченный полом, тип наследования

Голандрический тип наследования проявляется, если ген, определяющий признак, находится в Y-хромосоме. Поскольку в норме у мужчин только одна Y-хромосома, он всегда находится в гемизиготном состоянии. Все сыновья носителя такого признака также будут обладать им, а дочери – никогда (рис. 9).

Примеры:

- волосатые уши;
- оволосение средней фаланги пальцев.

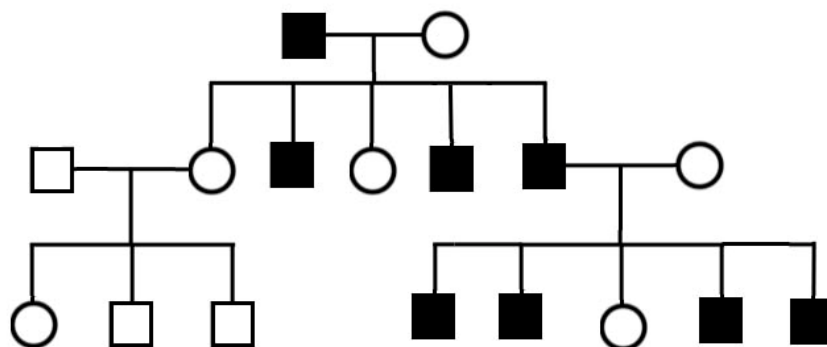


Рис. 9. Голандрический тип наследования

Митохондриальный тип объясняется цитоплазматической наследственностью, когда ген, определяющий признак, находится в геноме митохондрий. Поскольку при слиянии половых клеток от сперматозоида остается только пронуклеус (гаплоидное ядро), а вся цитоплазма оплодотворенной зиготы происходит от яйцеклетки, митохондриальный тип наследования означает передачу признака от матери ко всем ее потомкам (рис. 10). Мутации митохондриального генома, как правило, приводят к тяжелым нарушениям обмена веществ.

Примеры:

- митохондриальная миозкзенцефалия;
- атрофия зрительного нерва Лебера;
- болезнь Кернса – Сейра.

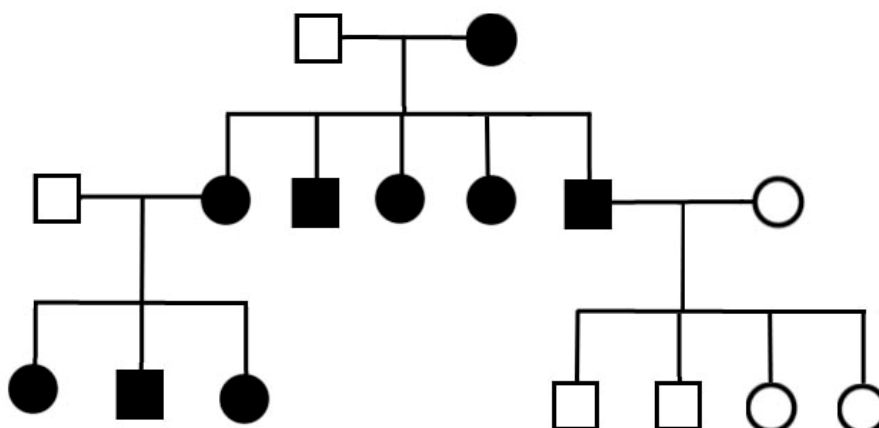


Рис. 10. Митохондриальный тип наследования

2.5. Полигенные различия

Если родительские формы различаются по двум признакам, то их скрещивание называется дигибридным. В этом случае говорят о дигенных различиях родительских форм. Если родительские формы различаются по трем и более признакам, то их скрещивание называется полигибридным. В этом случае говорят о полигенных различиях родительских форм.

P ♀ AABV X ♂ aавв

F₁ A-B- (по генотипу – AaBв)

F₂ 9 A-B- : 3 A-вв : 3 ааB- : 1 аавв

F_B 1 AaBв : 1 Aавв : 1 ааBV : 1 аавв

Пример

При скрещивании гороха с желтыми гладкими семенами (AABV) и зелеными морщинистыми (аавв) Мендель получил в первом поколении все семена желтые гладкие (A-B-, по генотипу – дигетерозиготы AaBв), во втором поколении – 9 желтых гладких (A-B-) : 3 желтых морщинистых (A-вв) : 3 зеленых гладких (ааB-) : 1 зеленых морщинистых (аавв).

Для выяснения генотипа потомков, исходя из генотипов родителей, служит решетка Пеннета. В верхней строке выписывают гаметы одного родителя, в левом столбце – гаметы другого. Во внутренних ячейках получаем генотипы потомков.

	AB	Av	aB	av
AB	AABV	AABв	AaBV	AaBв
Av	AABв	AAbb	AaBв	Aabv
aB	AaBV	AaBв	aaBV	aaBв
av	AaBв	Aabv	aaBв	aavv

Иногда признак определяется аллелями двух и более генов. Тогда дигенные и полигенные различия характеризуют особей, различающихся по аллелям двух и более генов. Независимое комбинирование генотипов возможно только если изучаемые гены расположены на разных хромосомах.

2.6. Взаимодействие генов

Продукты генов могут по-разному взаимодействовать. В этом случае проявление признака будет определяться аллелями двух и более генов. Если продукты двух и более генов дополняют действие друг друга, приводя к формированию нового признака, такой тип взаимодействия генов называется комплементарность.

Пример

У плодовой мушки *Drosophila melanogaster* коричневая окраска глаз определяется рецессивной мутацией bw , а аллелем дикого типа является bw^+ . Ярко-алые глаза наблюдаются у гомозигот по мутантному аллелю st , в то время как присутствие в генотипе одного аллеля дикого типа st^+ приводит к формированию нормального (красного) цвета глаз. Скрещиваем дрозофил с коричневыми и ярко-алыми глазами. В первом поколении наблюдается новообразование по сравнению с обеими родительскими формами – все гибриды имеют красные глаза (генотип $bw^+/bw\ st^+/st$). Следует отметить, что наличие новообразования всегда говорит о взаимодействии генов. Для установления генотипов и фенотипов гибридов второго поколения рисуем решетку Пеннета:

	$bw^+ st^+$	$bw^+ st$	$bw st^+$	$bw st$
$bw^+ st^+$	$bw^+/bw^+ st^+/st^+$ красные	$bw^+/bw^+ st^+/st$ красные	$bw^+/bw st^+/st^+$ красные	$bw^+/bw st^+/st$ красные
$bw^+ st$	$bw^+/bw^+ st^+/st$ красные	$bw^+/bw^+ st/st$ коричневые	$bw^+/bw st^+/st$ красные	$bw^+/bw st/st$ ярко алые
$bw st^+$	$bw^+/bw st^+/st^+$ красные	$bw^+/bw st^+/st$ красные	$bw/bw st^+/st^+$ коричневые	$bw/bw st^+/st$ коричневые
$bw st$	$bw^+/bw st^+/st$ красные	$bw^+/bw st/st$ коричневые	$bw/bw st^+/st$ коричневые	$bw/bw st/st$ белые

P ♀ $bw/bw\ st^+/st^+$ X ♂ $bw^+/bw^+ st/st$

F₁ $bw^+/-\ st^+/-$ (по генотипу – $bw^+/bw\ st^+/st$)

F₂ 9 $bw^+/-\ st^+/-$: 3 $bw^+/bw\ st/st$: 3 $bw/bw\ st^+/-$: 1 $bw/bw\ st/st$

$bw^+/-\ st^+/-$ – красные глаза (дикий тип)

$bw^+/bw\ st/st$ – ярко-алые глаза

$bw/bw\ st^+/-$ – коричневые глаза

$bw/bw\ st/st$ – белые глаза

Биохимическое объяснение состоит в том, что цвет глаз у дрозофилы определяется взаимодействием коричневого и ярко-алого пигментов. Мутация *bw* блокирует синтез ярко-алого пигмента, а мутация *st* – коричневого. У гомозигот по обеим мутациям *bw/bw st/bw* нет пигмента вообще, и как следствие, глаза белые. У гомозигот по *bw* нет ярко-алого пигмента – глаза коричневые (при условии наличия хотя бы одного доминантного аллеля *st*⁺), а у обладателей генотипов *bw*⁺/*bw*⁺ *st/st* и *bw*⁺/*bw* *st/st* – ярко-алые.

При комплементарном взаимодействии генов возможны расщепления по фенотипу 9 : 3 : 3 : 1, 9 : 3 : 4, 9 : 7.

Примерами комплементарного взаимодействия генов у человека являются врожденная глухота и наследование иммунного ответа к синтетическим полипептидам. Другим типом взаимодействия генов является эпистаз, когда действие одного гена подавляет действие другого.

Пример

При скрещивании белых кур и белых петухов, имеющих различное происхождение, в первом поколении все птицы были белые, а во втором поколении – 13 частей белых и 3 части окрашенных. Появление новообразования говорит о взаимодействии генов, а соотношение 13 : 3 (общее число частей – 16) является видоизменением соотношения 9 : 3 : 3 : 1, что свидетельствует о дигенных различиях. Наличие окраски у кур определяется доминантным аллелем *C*, у гомозигот *cc* окраска белая. Доминантный ингибитор окраски *I* действует независимо от генотипа по гену *C*, подавляя формирование окрашенных перьев.

P ♀ *IICC* X ♂ *ii cc*

F₁ *I-C-* (по генотипу – *IiCc*)

F₂ 13 белые (9 *I-C-* + 3 *I-cc* + 1 *ii cc*) : 3 окрашенным (3 *iiC-*).

Частным случаем эпистаза является супрессия, когда подавляющим действием обладает рецессивный аллель эпистатирующего гена. При доминантном эпистазе отмечается расщепление 13 частей мутантных особей : 3 частям особей

дикого типа (частный случай 12 : 3 : 1), а при супрессии – 13 частей особей дикого типа : 3 частям мутантных особей.

У человека эпистатические взаимодействия генов наблюдаются, например, при наследовании склонности к ожирению, предрасположенности к склерозу, риноконъюнктивиту.

Полимерным называется взаимодействие генов, которое изменяет проявление признака количественно. Иначе говоря, при совместном действии двух или более генов наблюдается изменение степени выраженности признака.

Различают некумулятивную и кумулятивную полимерию. В первом случае фенотипические отличия отмечаются только у гомозиготных рецессивов по двум генам (расщепление 15 : 1), а во втором случае у гибридов второго поколения присутствуют градуальные различия (1 : 4 : 6 : 4 : 1) пропорционально числу доминантных аллелей любого из двух генов-участников. Гены, взаимодействующие по типу полимерии, обычно обозначают одинаковыми буквами с разными цифровыми индексами – A_1 , A_2 , A_3 .

Примеры:

1. Некумулятивная полимерия наблюдается, например, при наследовании признака форма плода у пастушьей сумки (*Capsella bursa-pastoris*). При скрещивании родительских форм с треугольными плодами (генотип $A_1A_1A_2A_2$) и овальными плодами (генотип $a_1a_1a_2a_2$) в первом поколении гибриды имеют треугольные плоды, во втором наблюдается расщепление – 15 частей растений с треугольными плодами : 1 часть растений с овальными плодами. Для формирования рецессивного фенотипа необходимо полное отсутствие доминантных аллелей обоих генов – A_1 и A_2 .

$P \quad \text{♀ } A_1A_1A_2A_2 \times \text{♂ } a_1a_1a_2a_2$

F_1 треугольные плоды (по генотипу – $A_1a_1A_2a_2$)

F_2 15 треугольные плоды (все генотипы кроме $a_1a_1a_2a_2$) : 1 овальные плоды ($a_1a_1a_2a_2$).

2. Признак «окраска кожи» у человека наследуется по типу кумулятивной полимерии. Наличие четырех доминантных аллелей ($A_1A_1A_2A_2$) приводит к формированию черной окраски кожи. В генотипе темных мулатов присутствуют три любых доминантных аллеля этой серии (т. е. A_1 или A_2 в любой комбинации). Для формирования окраски кожи, свойственной средним мулатам, достаточно двух доминантных аллелей, а светлых мулатов – одного. Наконец, белый цвет кожи наблюдается у гомозиготных рецессивов по двум генам – генотип $a_1a_1a_2a_2$.

Пример

На одном из островов у побережья Африки пираты провозгласили свободную республику. Все мужчины имели белую окраску кожи, а женщины – освобожденные рабы – черную:

$P \quad \text{♀} \quad A_1A_1A_2A_2 \times \text{♂} \quad a_1a_1a_2a_2$

F_1 средние мулаты (по генотипу – $A_1a_1A_2a_2$)

F_2 1 черные ($A_1A_1A_2A_2$) : 4 темные ($2 A_1A_1A_2a_2 + 2 A_1a_1A_2A_2$) : 6 средние ($2 A_1A_1a_2a_2 + 2 a_1a_1A_2A_2 + 2 A_1a_1A_2a_2$) : 4 светлые ($2 a_1a_1A_2a_2 + 2 A_1a_1a_2a_2$) : 1 белые ($a_1a_1a_2a_2$).

Во втором поколении только $1/8$ потомков имеет фенотип одной из родительских форм и $3/8$ – фенотип гибридов первого поколения. Оставшиеся $1/2$ – обладатели новых фенотипов по признаку «окраска кожи».

Иногда один ген имеет влияние на два и более признака. Такое явление называется плейотропией. Например, альбинизм у человека часто связан с ухудшением слуха, рыжая окраска волос – с более светлым цветом кожи и появлением веснушек, серповидноклеточная анемия – с устойчивостью к малярии. Особенно интересно рецессивное летальное (приводящее к смерти) действие некоторых доминантных мутаций (мраморный окрас у собак породы колли, укороченный хвост у кошек породы мэнкс, сложенные уши у кошек породы скоттиш фолд). В этом случае признак проявляется только у гетерозигот, а мутантный аллель в гомозиготном состоянии приводит к гибели.

2.7. Сцепленное наследование

Два типа наследования – сцепленное с полом доминантное и сцепленное с полом рецессивное – объясняются локализацией исследуемых генов в половой X-хромосоме. Иными словами, пол, рассматриваемый как простой признак, и другой изучаемый признак наследуются совместно. Сцепление с полом – частный случай сцепленного наследования, смысл которого заключается в нарушении принципа независимого наследования двух и более признаков по причине нахождения обуславливающих их генов в одной хромосоме.

На вопрос о том, является ли наследование сцепленным с полом, могут ответить реципрокные скрещивания – когда родительские формы меняют местами. Например, вначале доминантной родительской формой являются самки, затем самцы. Различные результаты реципрокных скрещиваний свидетельствуют о сцеплении признака с полом.

Пример

Белая окраска глаз у дрозофилы может определяться мутантным аллелем w . Ген w локализован в X-хромосоме и может быть представлен аллелем дикого типа w^+ (красная окраска глаз) и мутантным аллелем w . Гомо- и гетерозиготными могут быть только самки, а самцы всегда гемизиготны по локусу w . Результаты реципрокных скрещиваний представлены на рис. 11. В случае скрещивания белоглазых самок с красноглазыми самцами в первом поколении все самки красноглазые, а все самцы – белоглазые. Если скрестить красноглазых самок с белоглазыми самцами, то все потомки независимо от пола будут иметь красную окраску глаз.

$$P \quad \text{♀} \frac{W}{W} \quad \times \quad \text{♂} \frac{W^+}{W^+} \\ \text{белые} \qquad \qquad \text{красные}$$

$$F_1 \quad \text{♀} \frac{W^+}{W} \quad , \quad \text{♂} \frac{W}{W^+} \\ \text{красные} \qquad \qquad \text{белые}$$

Реципрокно:

$$P \quad \text{♀} \frac{W^+}{W^+} \quad \times \quad \text{♂} \frac{W}{W} \\ \text{красные} \qquad \qquad \text{белые}$$

$$F_1 \quad \text{♀} \frac{W^+}{W} \quad , \quad \text{♂} \frac{W^+}{W^+} \\ \text{красные} \qquad \qquad \text{красные}$$

Рис. 11. Реципрокные скрещивания для установления типа наследования белой окраски глаз у *Drosophila melanogaster*

Если два или более признаков определяются генами, локализованными на одной аутосоме, то говорят об аутосомном сцеплении (или просто сцеплении). Сцепление может быть полным, когда родительские комбинации аллелей всегда передаются потомкам, что объясняется отсутствием обмена участками хромосом (кроссинговера) в районе между исследуемыми генами. Предположим, между генами А и В – полное сцепление, тогда:

$$P \quad \text{♀} AABV \times \text{♂} aavv$$

$$F_1 AaBv.$$

Гибриды первого поколения образуют следующие гаметы:

	AB	ав
AB	AABV	AaBv
ав	AaBv	aavv

$$F_2 \quad 1 AABV : 2 AaBv : 1 aavv.$$

Если на участке между А и В происходит кроссинговер (рекомбинация), то кроме родительских сочетаний аллелей, например АВ и ав, будут появляться и рекомбинантные сочетания: Ав и аВ. Гаметы, несущие рекомбинантные сочетания аллелей, называются кроссоверными гаметами, а происшедшие в результате их слияния особи – кроссоверными особями. Соотношения кроссоверных и некроссоверных особей зависит от расстояния на хромосоме между изучаемыми генами – чем дальше они друг от друга, тем чаще случается кроссинговер на участке между местами их локализации и тем больше кроссоверных особей. Рекомбинационное расстояние между двумя генами – это отношение числа кроссоверных гамет к общему числу гамет, умноженное на сто. Единицей рекомбинационного расстояния является 1 сантиморган (сМ). Следует отметить, что в анализирующем скрещивании F_A соотношение кроссоверных и некроссоверных гамет будет равно соотношению кроссоверных и некроссоверных особей. Если одна родительская форма несет два доминантных аллеля (АВ), а другая два рецессивных (ав) – это состояние притяжения, а если родительские формы несут по одному доминантному и одному рецессивному аллелю (Ав и аВ) – это состояние отталкивания.

Пример

У дрозофилы черная окраска тела определяется аллелем b , а b^+ – аллель дикого типа. Мутация pr в гомозиготе приводит к пурпурной окраске глаз, нормальный – красный – цвет глаз определяется аллелем pr^+ . Скрещиваем черных мух с пурпурными глазами ($bbprpr$) и серых мух с красными глазами ($b^+b^+pr^+pr^+$). Обращаем внимание на то, что аллели находятся в состоянии притяжения. Все гибриды первого поколения гетерозиготны и имеют фенотип второй родительской формы. В анализирующем скрещивании получаем:

серое тело, красные глаза – 1000

серое тело, пурпурные глаза – 64

черное тело, красные глаза – 62

черное тело, пурпурные глаза – 831.

Следует отметить, что гомозиготных рецессивов всегда несколько меньше, чем доминантных гомозигот из-за некоторого снижения жизнеспособности.

Нетрудно рассчитать рекомбинационное расстояние между генами *b* и *pr*:

$$(64 + 62) : (1000 + 64 + 62 + 831) \times 100 = 6,4 \text{ сМ.}$$

Используя большое число генов – маркеров генетического анализа – можно построить генетические карты хромосом с указанием взаимного расположения и расстояния между маркерами. Каждая хромосома будет соответствовать одной группе сцепления. Если расстояние между двумя маркерами больше 50 сМ (что соответствует проценту кроссинговера при независимом наследовании), маркеры наследуются, не проявляя сцепления друг с другом. Поэтому для повышения точности генетических карт необходимо использовать как можно большее число маркеров. На точность определения генетических расстояний влияет и явление генетической интерференции – подавления кроссинговера на участках, находящихся вблизи от участка, где уже происходит рекомбинация.

Контрольные вопросы и задания

1. Определите типы наследования в родословных, приведенных на рис. 12.

2. При скрещивании кошек с разной окраской шерсти было получено:

P самки черные x самцы рыжие

F₁ самки черепаховые
самцы черные

F₂ самки черепаховые и черные
самцы черные и рыжие

P самки рыжие x самцы черные

F₁ самки черепаховые
самцы рыжие

F₂ самки черепаховые и рыжие
самцы черные и рыжие

Определите генотипы скрещиваемых форм и локализацию генов.

3. Какие группы крови возможны у ребенка, если его родители имеют группы крови А и В и оба являются: а) гетерозиготами, б) один из родителей гетерозиготен.

4. Потемнение зубов определяется двумя доминантными генами, один из которых находится в X-хромосоме, а другой – в аутосоме. В семье, где родители имели темные зубы, родились девочка и мальчик с нормальным цветом зубов. Темные зубы матери определены геном, сцепленным с X-хромосомой, а темные зубы отца – аутосомным геном. Определите генотипы родителей и детей.

5. Заболевание обнаруживается у детей, родители которых являлись двоюродными братом и сестрой и не страдали от этого заболевания. Как наследуется болезнь?

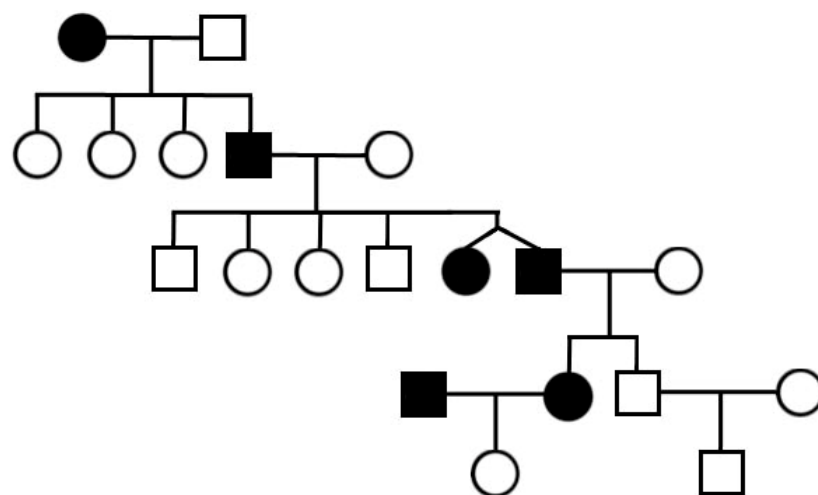
6. Известно, что ген гемофилии и ген дальтонизма – рецессивные, локализованные в X-хромосоме; расстояние между ними – 9,8 сМ. Здоровая девушка, мать которой дальтоник, а отец – гемофилик, выходит замуж за здорового мужчину, родители которого здоровы. Определите, какова вероятность появления в этой семье здоровых детей.

7. Резус-положительность и эллиптоцитоз определяются доминантными аутосомными генами. Лocus резус-фактора (Д) и locus эллиптоцитоза (Е), вызывающего овальную форму эритроцитов, находятся сцепленно в одной аутосоме на расстоянии 3 сМ. Мать гетерозиготна по обоим анализируемым признакам. Отец резус-отрицателен и имеет нормальные эритроциты. Определите процентное соотношение вероятных генотипов и фенотипов детей в семье.

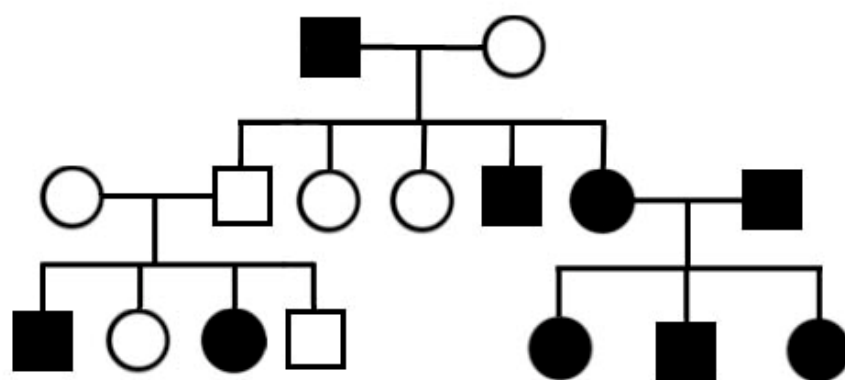
8. Гипертрихоз передается через Y- хромосому, а полидактилия – как аутосомный признак. В семье, где отец имел гипертрихоз, а мать – полидактилию, родилась нормальная в отношении обоих признаков дочь. Какова вероятность рождения сына без обеих аномалий?

9. У супругов с нормальным зрением родилось два сына и две дочери. У первой дочери зрение нормальное; у нее три сына, два из которых дальтоники. У второй дочери и у ее пяти сыновей зрение нормальное. Первый сын дальтоник; у него две дочери и два сына, и все видят нормально. Второй сын и четверо его сыновей также имеют нормальное зрение. Каковы генотипы всех родственников?

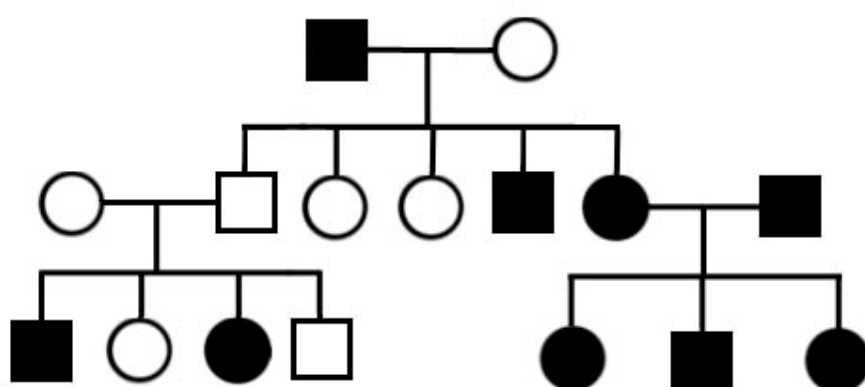
10. На рис. 13 приведены генотипические данные особей второго поколения скрещивания дрозофил. Установите генотипы родителей.



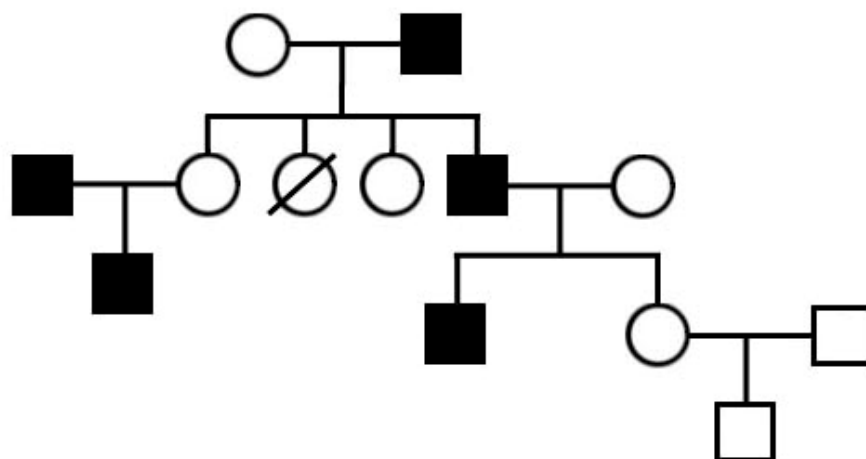
A.



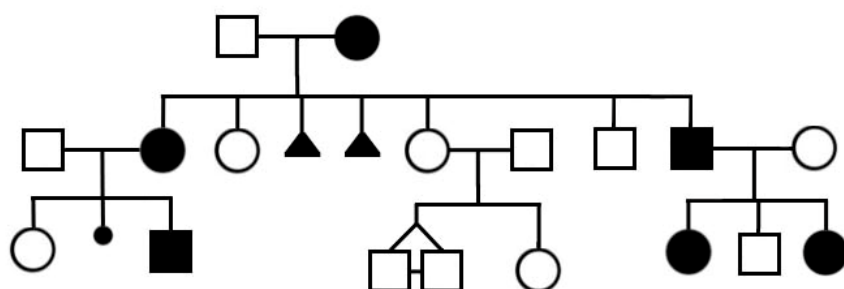
Б.



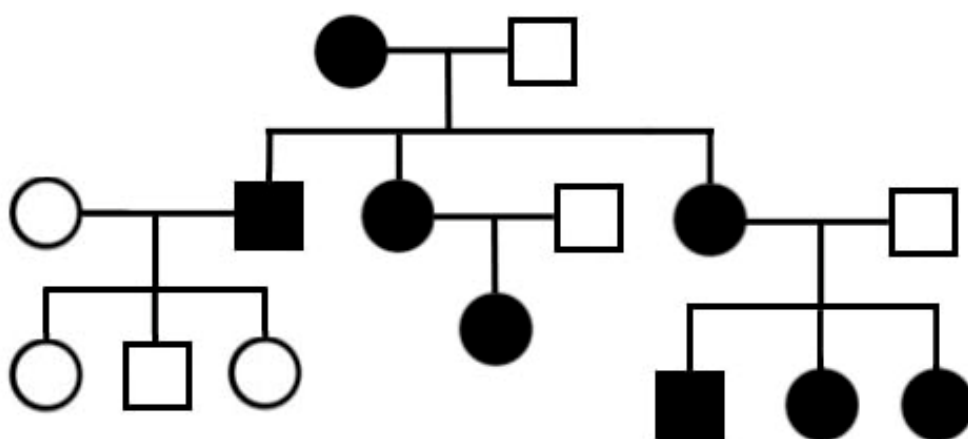
B.



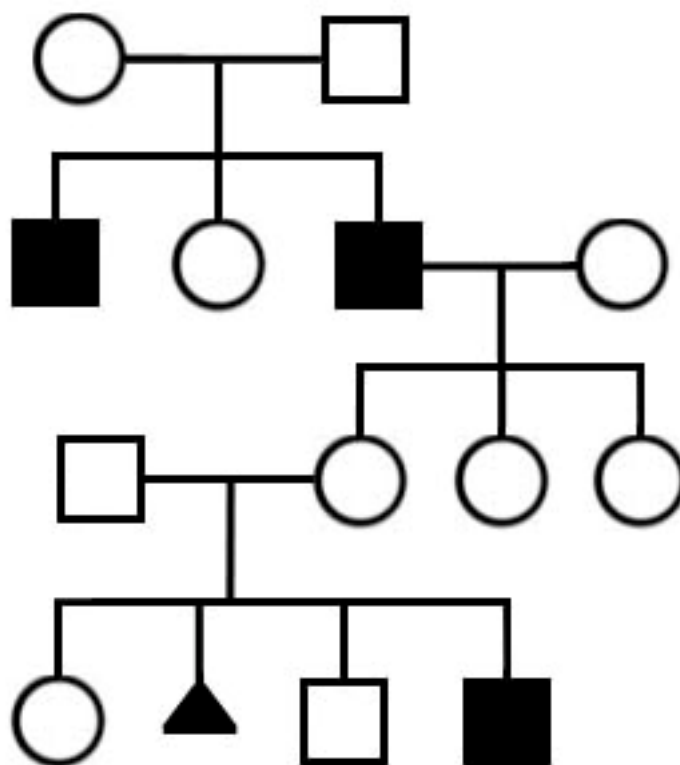
Г.



Д.



Е.



Ж.

Рис. 12. Примеры родословных (для задачи 1 к гл. 2)

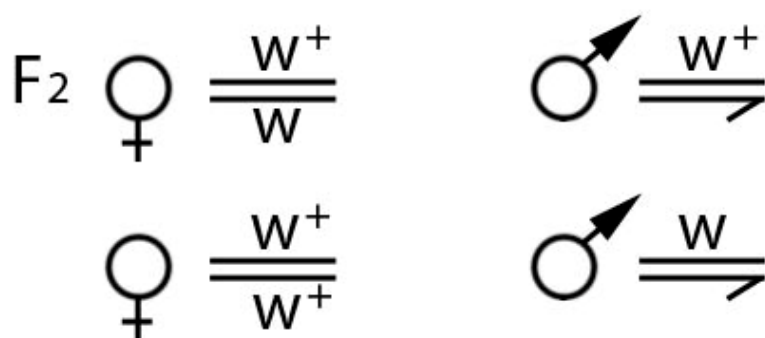


Рис. 13. Генотипические данные особей второго поколения скрещивания дрозофил (для задачи 10 к гл. 2)

Глава 3. Основы популяционной генетики

В генетике человека особое значение имеет популяционный метод, который позволяет изучать гены и генотипы без постановки скрещиваний. В основе этого метода лежит закон, сформулированный в 1908 г. английским математиком Г. Харди и немецким врачом В. Вайнбергом независимо друг от друга, и названный законом Харди-Вайнберга. Условия для выполнения этого закона следующие:

- популяция должна иметь неограниченный размер (быть достаточно многочисленной по меркам статистики);
- генотип по изучаемым генам не должен влиять на выбор брачного партнера (скрещивание должно быть свободным, т. е. не ассортативным);
- миграция не должна существенно изменять генотип популяции;
- должен отсутствовать отбор по аллелям изучаемых генов.

В большинстве популяций человека для большинства признаков эти условия соблюдаются. Исключения, когда закон Харди-Вайнберга не может выполняться:

- островные, отдаленные и высокогорные популяции, где из-за небольшого числа особей случайные факторы могут влиять на частоты аллелей;
- избирательность (ассортативность) связей, приводящих к рождению детей. Например, в США браки белых мужчин с белыми женщинами и черных мужчин с черными женщинами встречаются намного чаще, чем смешанные;
- иммиграция большого числа носителей редких в популяции генотипов;
- гены, аллели которых по-разному влияют на жизнеспособность и репродуктивную функцию.

Если частота в популяции доминантного аллеля A составляет p , то частота рецессивного аллеля a будет $q = 1 - p$. Согласно первому положению закона Харди-Вайнберга эти значения будут неизменны из поколения в поколение (при условии выполнения требований, изложенных выше) – это со-

стояние генетического равновесия в популяции. Соотношение равновесных частот генотипов будет определяться возведением соотношения частот аллелей в квадрат – это второе положение закона. И согласно третьему положению закона Харди-Вайнберга равновесие частот генотипов достигается за одно поколение и остается неизменным. Математически он может быть записан следующим образом:

$$(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2, \text{ где}$$

p – частота доминантного аллеля A ;

q – частота рецессивного аллеля a ;

p^2 – частота генотипа AA (доминантные гомозиготы);

$2pq$ – частота генотипа Aa (гетерозиготы);

q^2 – частота генотипа aa (гомозиготных рецессивов).

Пример

Одна из форм альбинизма (отсутствие пигментации кожи, радужной и пигментной оболочек глаза) у человека обусловлена редким рецессивным аллелем a (мутация в гене тирозиназы). В некоторой популяции частота альбиносов равна 0,0001. Тогда,

q – частота рецессивного аллеля a – $\sqrt{0,0001} = 0,01$;

p – частота доминантного аллеля A – $1 - 0,01 = 0,99$;

p^2 – частота генотипа AA (доминантные гомозиготы) – $0,99^2 = 0,98$;

$2pq$ – частота генотипа Aa (гетерозиготы) – $2 \times 0,99 \times 0,01 = 0,02$.

Из примера видно, что гетерозигот по гену альбинизма в популяции в 200 раз больше, чем альбиносов.

В случае множественного аллелизма используют аналогичные расчеты.

Пример

В популяции индусов I группа крови встречается с частотой 0,314, II – 0,189, III – 0,410, IV – 0,087.

Пусть частота аллеля I^0 – r , аллеля I^A – p , аллеля I^B – q .

Тогда носителей генотипа $I^0 I^0$ (I группа) будет r^2 . Таким образом,

$$r^2 = 0,314;$$

$$r = \sqrt{0,314} = 0,560.$$

Общая частота аллелей I^A и I^B ($p + q$) = $1 - r = 1 - 0,560 = 0,440$

Суммарная частота групп крови I и III равна $(q + r)^2$. Таким образом,

$$(q + r)^2 = 0,314 + 0,410 = 0,724$$

$$(q + r) = \sqrt{0,724} = 0,851$$

$$q = 0,851 - 0,560 = 0,291$$

$$p = 1 - q - r = 1 - 0,291 - 0,560 = 0,149$$

Итак, частоты аллелей групп крови системы АВО в популяции индусов следующие: $I^0 - 0,560$, $I^A - 0,149$, $I^B - 0,291$.

В большинстве популяций наблюдается дрейф генов – изменение частот аллелей под влиянием случайных факторов. Эффект бутылочного горлышка – случайной гибели носителей того или иного генотипа при существенном снижении размера популяции – является наиболее частой причиной дрейфа генов. В небольших популяциях можно встретить эффект основателя – когда одна особь (почти всегда мужчина, например, Чингизхан) оставляет огромное число потомков, вследствие чего изменяется соотношение частот аллелей и генотипов.

Исходя из закона Харди-Вайнберга нетрудно убедиться, что отбор против гомозиготных рецессивов неэффективен: элиминация (устранение) q^2 носителей генотипа aa не влияет существенно на частоты аллелей. Большинство носителей рецессивного аллеля являются гетерозиготами. В этом причина генетического груза в популяциях человека – значительного числа гетерозиготных носителей летальных (приводящих к смерти) аллелей и аллелей, связанных со снижением жизнеспособности и репродуктивной функции. Понятие генетического груза является фундаментальным в популяционной генетике, его ввел Г. Меллер в 1950 г. в своей книге «Наш груз мутаций». Для расчета порядкового номера поколения (t), в котором начальная частота рецессивного аллеля (q_0) примет ожидаемое

значение q_t при отборе против гомозиготных рецессивов, используют формулу

$$t = \frac{1}{q_t} - \frac{1}{q_0} .$$

Пример

Частота рецессивного летального аллеля 0,01. Требуется установить, сколько потребуется поколений для ее уменьшения в 10 раз при условии отсутствия новых мутаций?

$$q_0 = 0,01$$

$$q_t = 0,001$$

$$t = \frac{1}{0,001} - \frac{1}{0,01} = 1000 - 100 = 900 .$$

Итак, для уменьшения частоты рецессивного летального аллеля с 0,01 до 0,001 потребуется целых 900 поколений.

Контрольные вопросы и задания

1. Рассчитайте частоты аллелей групп крови системы АВ0 в популяции англичан, где I группа крови встречается с частотой 0,462, II – 0,436, III – 0,074, IV – 0,028.
2. Изменяется ли генетический груз в популяциях человека со временем? Если да, то благодаря действию каких факторов?
3. На одном острове дикари приносили в жертву всех альбиносов до достижения ими половозрелого возраста. Изначальная частота встречаемости носителей этого фенотипа была 0,0001. Насколько она изменилась через 180 поколений?

Глава 4. Близнецовый метод

В предыдущих главах речь шла о наследовании дискретных (качественных) признаков. Большинство морфологических (рост, телосложение, форма отдельных частей тела), физиологических (интенсивность обмена веществ, скорость роста) и психологических (темперамент) признаков являются количественными, их можно выражать числовыми значениями и сравнивать между собой. Одним из подходов генетического анализа количественных признаков у человека является близнецовый метод.

Следует различать два принципиальных типа близнецов – разнаяйцовые (дизиготные), которые возникают при оплодотворении двух разных яйцеклеток двумя различными сперматозоидами, и однайцовые (монозиготных), которые появляются в результате дробления уже оплодотворенной яйцеклетки (зиготы). Дизиготные близнецы ничем не отличаются от обычных сиблингов. Монозиготные близнецы являются клонами – генетически идентичными организмами.

Известны случаи, когда дизиготные близнецы имели разных отцов. В этом случае, с точки зрения генетики, они являются полусибсами. Рождение однополых дизиготных близнецов случается несколько чаще, чем разнополых, но это связано скорее всего с разной подвижностью сперматозоидов, несущих X- и Y-хромосомы. Разнаяйцовые близнецы появляются в результате одновременного созревания двух и более яйцеклеток – полиовуляции, которая обычна для многих млекопитающих, но у человека происходит с небольшой частотой. Склонность к полиовуляции наследуется (если у женщины уже были близнецы, то частота их рождения во второй раз в четыре раза выше, чем в среднем в популяции).

Монозиготные близнецы иногда разделены не полностью, у них могут быть даже общие органы. В таких случаях производят хирургическое разделение, зачастую сопряженное с риском для жизни обоих близнецов.

Средняя частота рождения монозиготных близнецов – около 40 на 10000 и мало варьирует в разных популяциях человека. Дизиготные близнецы чаще рождаются у представителей негроидной расы (около 100 на 10000), у европеоидов – около

80 на 10000, у монголоидов – около 20 на 10000. Этот факт можно объяснить наследственным характером склонности к полиовуляции и негенетическими причинами дробления оплодотворенной яйцеклетки.

Влияние на признак наследственности и факторов среды можно определить исходя из степени сходства (конкордантности) дизиготных (имеющих разный генотип, но выросших в близких условиях) и монозиготных (имеющих один генотип и выросших в близких условиях) близнецов. Особое значение имеет изучение разлученных в младенческом возрасте монозиготных близнецов (рис. 1), так как они выросли в разных условиях, но являются генетически идентичными организмами. Существенным ограничением метода является то, что он позволяет установить только факт наследования изучаемого признака, но не дает возможности ответить на вопросы о типе наследования, количестве участвующих генов и их возможном взаимодействии.



Рис. 14. Разлученные в раннем возрасте близнецы, выросшие в разных социальных условиях

Контрольные вопросы и задания

1. У отца вторая группа крови, у матери – первая. Родились близнецы – мальчик с первой группой крови и девочка – с четвертой. Может ли формальный отец считаться биологическим отцом этих детей?
2. Зависит ли вероятность рождения близнецов у супружеской пары от наличия или отсутствия близнецов среди кровных родственников жены и мужа?

Глава 5. Цитогенетика человека

Цитогенетика – наука о связи внутриклеточных структур и наследственности. Она находится на стыке генетики (науки о наследственности и изменчивости) и цитологии (науки о клетке).

5.1. Внутриклеточные носители наследственной информации у человека – ядро и митохондрии

Ядро (лат. *nucleus*) – органелла эукариотической клетки, содержащая молекулы ДНК, которые несут генетическую информацию. В ядре происходят важнейшие для жизни процессы: репликация – удвоение молекул ДНК, а также транскрипция – синтез молекул РНК на молекуле ДНК. Здесь же синтезированные молекулы РНК подвергаются ряду модификаций и только после этого выходят в цитоплазму. В особых структурах внутри ядра – ядрышках – происходит образование субъединиц рибосом.

Ядро отделено от цитоплазмы ядерной оболочкой, образованной за счёт расширения и слияния друг с другом цистерн эндоплазматической сети таким образом, что у ядра образовались двойные стенки за счёт окружающих его узких компарментов. Полость ядерной оболочки называется люменом или перинуклеарным пространством. Внутренняя поверхность оболочки ядра подстилается ядерной ламиной – жёсткой белковой структурой, образованной белками-ламинами, к которой прикреплены нити хромосомной ДНК. Ламины прикрепляются к внутренней мембране ядерной оболочки при помощи заякоренных в ней трансмембранных белков – рецепторов ламинов. В местах слияния внутренней и внешней мембран ядерной оболочки образуются так называемые ядерные поры, через которые происходит обмен веществ между ядром и цитоплазмой. Пора не является дыркой в ядре. Это сложная структура, организованная несколькими десятками особых белков – нуклеопоринов. С помощью электронной микроскопии было установлено, что ядерная пора представляет собой структуру, состоящую из восьми связанных друг с другом белковых гранул с внешней, и восьми – с внутренней стороны ядерной оболочки.

Ядрышко – структура, находящаяся внутри ядра, не имеющая собственной мембранной оболочки, однако хорошо различима как под световым, так и под электронным микроскопом. Основная функция ядрышка – синтез рибосом. В хромосомах имеются так называемые ядрышковые организаторы – специальные участки, содержащие гены рибосомной РНК (рРНК), вокруг которых и формируются ядрышки. В ядрышке полимераза I синтезирует рРНК. После созревания этой РНК происходит сборка рибосомных субчастиц. В ядрышке локализируются белки, принимающие участие в этих процессах. Для некоторых из этих белков характерно наличие особой аминокислотной последовательности – сигнала ядрышковой локализации. Следует отметить, что в ядрышке локализуется около 600 видов различных белков. Это самая высокая концентрация белка в клетке. Считается, что для осуществления функций ядрышка необходима лишь небольшая часть этих белков, а остальные попадают туда неспецифически.

Применение методов электронной микроскопии позволило выделить в ядрышке несколько субкомпартментов: так называемые фибриллярные центры, окруженные участками плотного фибриллярного компонента, где и происходит синтез рРНК, и гранулярные компоненты, которые располагаются снаружи от плотного фибриллярного компонента и представляют собой скопление созревающих рибосомных субчастиц.

При делении клеток отдельные молекулы ДНК подвергаются компактизации, становятся различимы хромосомы – нуклеопротеиновые комплексы, состоящие из двух хроматид, соединенных центромерой – первичной перетяжкой (рис. 15). Поскольку хроматиды являются результатом репликации (удвоения) одной молекулы ДНК, их называют сестринскими. Каждая хроматида разделена центромерой на две части – плечи. Обычно плечи хромосом не равны по длине, выделяют короткое (обозначается латинской буквой р) и длинное плечо (обозначается буквой q). Отношение длины короткого плеча к длине всей хромосомы, называют центромерным индексом. Различают метацентрические хромосомы (центромерный индекс 0,35–0,50), субметацентрические (0,25–0,35) и акроцентрические ($< 0,25$). Концевые районы хромосом называются теломерами.

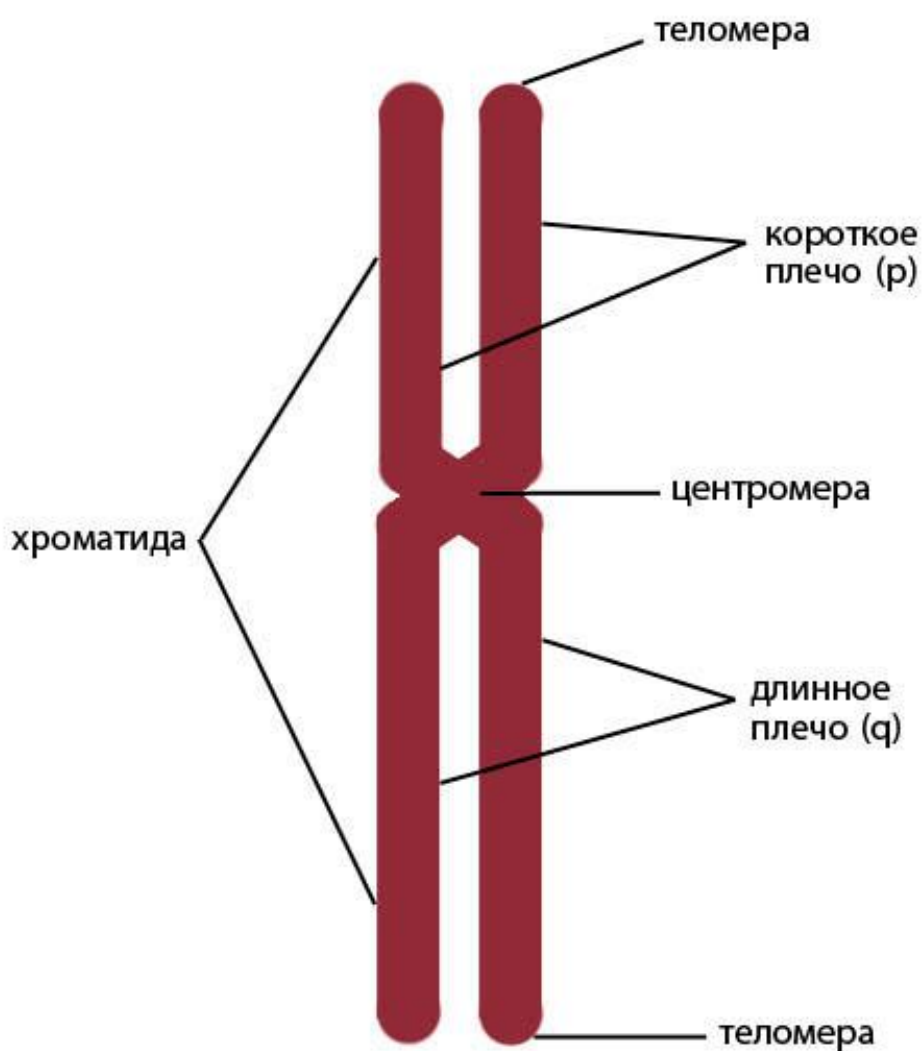


Рис. 15. Схематическое изображение хромосомы

Митохондрии – органеллы, имеющиеся в цитоплазме многих эукариотических клеток. Именно в митохондриях происходит синтез АТФ – основного источника химической энергии клетки. Эффективность работы митохондрий очень высока. На фотографиях митохондрий видно обилие внутренних мембран (рис. 16). Количество и форма митохондрий сильно различаются в разных тканях и зависят от интенсивности обмена веществ. Например, в одной клетке печени млекопитающих может быть 1000–1500 митохондрий.



Рис. 16. Электронная микрофотография среза митохондрии

Оболочка митохондрий состоит из двух мембран, между которыми имеется межмембранное пространство. Пространство, ограниченное внутренней мембраной, называется матриксом. В матриксе располагаются митохондриальные ДНК, РНК и рибосомы, содержатся ферменты, участвующие в цикле Кребса, протекают реакции окисления жирных кислот. Внутренняя мембрана образует многочисленные гребневидные складки – кристы, существенно увеличивающие площадь ее поверхности. На обращенной к матриксу стороне внутренней мембраны митохондрий локализуются особые молекулы АТФ-синтазы, состоящие из головки, ножки и основания. При прохождении через них протонов происходит синтез АТФ. В основании частиц, заполняя собой всю толщу мембраны, располагаются компоненты дыхательной цепи. Наружная мембрана митохондрий имеет маленькие отверстия, образованные специальными белками, через которые могут проникать небольшие молекулы и ионы. Внутренняя мембрана таких отверстий не имеет. В местах соприкосновения наружной и внутренней мембран находится

специальный белок-рецептор, способствующий транспорту митохондриальных белков, закодированных в ядре, в матрикс митохондрии.

Митохондриальный геном человека представлен кольцевой молекулой ДНК длиной 16569 п.н. (пар нуклеотидов), которая содержит 37 генов (13 из них кодируют белки, функционально связанные с энергетическим обменом, 22 – транспортные РНК и 2 – рибосомальную РНК). ДНК митохондрий наследуется исключительно по материнской линии. В митохондриальной ДНК наблюдается высокая частота мутаций. Мутации митохондриальной ДНК являются причиной целого ряда наследственных заболеваний человека, обычно связанных с тяжелыми нарушениями обмена веществ.

5.2. Митоз, мейоз и особенности созревания половых клеток человека

Для большинства нормальных клеток человека характерно деление путем митоза – упорядоченного расхождения хроматид к полюсам клетки при помощи веретена деления с последующим формированием генетически идентичных дочерних клеток. Клеточный цикл состоит из интерфазы – периода между двумя клеточными делениями – и митоза (рис. 17). Интерфаза включает фазу G_1 – синтез белка, предшествующий удвоению ДНК, фазу S – репликация (удвоение) ДНК и фазу G_2 – пострепликационный синтез белка. Иногда клетки переходят в фазу G_0 – пролиферативного покоя, когда окончательно специализированные клетки перестают делиться. На стадии S часто происходят сестринские хроматидные обмены (СХО, рис. 18), частота которых зависит от внешних влияний на клетку. Специальные методы окрашивания позволяют выявлять СХО. Повышенная частота СХО служит индикатором вредных влияний на клетки.

Митоз включает следующие стадии:

I – *профаза*. Конденсация хроматина приводит тому, что хромосомы становятся видимыми, сестринские хроматиды тесно прилежат друг ко другу. Ядрышко исчезает, кариолемма (оболочка ядра) растворяется, формируется веретено деления;

II – *метафаза*. Хромосомы располагаются в экваториальной плоскости клетки. К центромерам прикреплены нити ахроматинового веретена, другие концы которых закреплены в центриолях на полюсах клетки. Хроматиды начинают отделяться одна от другой, оставаясь соединенными только в центромерах. Центромеры разъединяются, и сестринские хроматиды начинают расхождение к полюсам клетки;

III – *анафаза*. Сестринские хроматиды расходятся к полюсам клетки;

IV – *телофаза*. Происходит деконденсация хроматина, формируются дочерние ядра, веретено деления дезинтегрируется, появляется перетяжка между дочерними клетками.

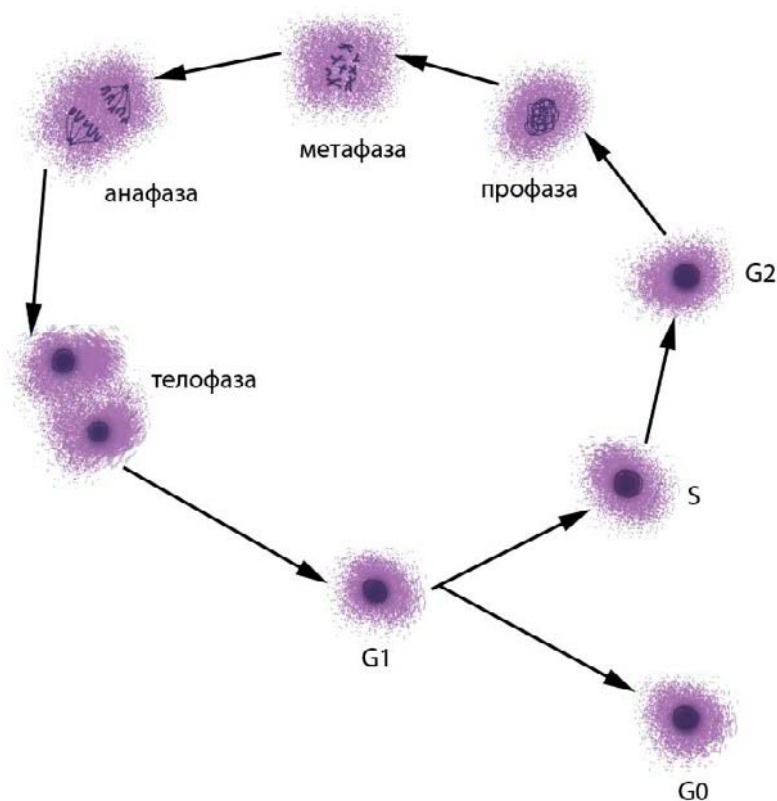
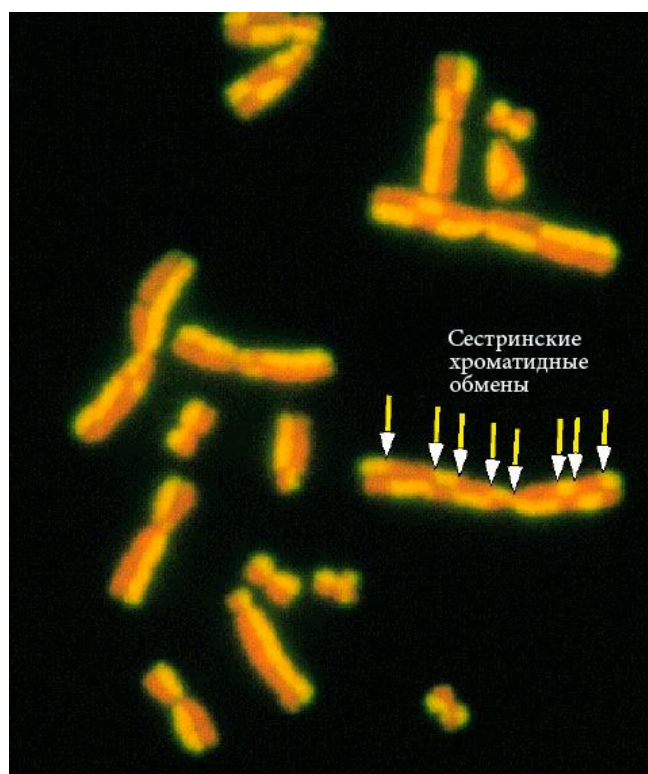
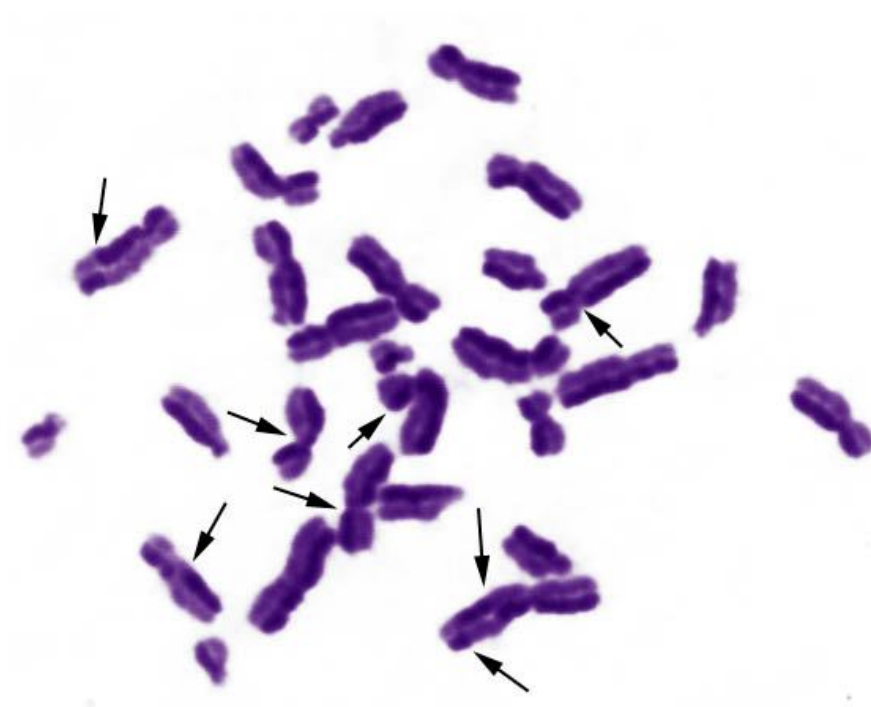


Рис. 17. Стадии клеточного цикла

Хромосомы лучше всего видны на стадии метафазы, поэтому основным методом цитогенетики является метафазный анализ. Для того чтобы накопить достаточное количество клеток на стадии метафазы, используют колхицин – вещество, которое растворяет трубочки ахроматинового веретена, препятствуя агрегации молекул тубулина, из которого состоят микротрубочки.



А.



Б.

Рис. 18. Сестринские хроматидные обмены:
 А. Флуоресцентный вариант*
 Б. Нефлуоресцентный вариант (фото Е.Г. Нероновой)

* URL: http://www.crios.be/genotoxicitytests/sister_chromatid_exchange_test.htm.

С точки зрения передачи наследственной информации все клетки можно подразделить на два типа – генеративные (половые), т. е. те, которые участвуют в формировании генотипа потомков, и соматические (от лат. *soma* – тело), гены которых не передаются потомкам. Если для соматических клеток характерно митотическое деление, то для формирования половых клеток (гамет) необходим мейоз. Мейоз (от греческого *meiosis* – уменьшение) – это тип деления клетки, при котором число хромосом уменьшается вдвое – каждая дочерняя клетка получает по гаплоидному набору хромосом, т. е. набору, где каждая хромосома представлена одним гомологом из двух, пришедших от каждого из родителей индивидуума. Гаплоидное число хромосом обозначается n , у человека $n = 23$. Такое число хромосом имеют яйцеклетки и сперматозоиды. Соматические клетки содержат диплоидное число хромосом $2n = 46$. Биологическое значение мейоза заключается: (1) в формировании гаплоидных клеток, которые при слиянии могут дать начало диплоидному организму и (2) в рекомбинации хромосом – кроссинговер происходит в профазе I, а в анафазе I гомологичные хромосомы случайным образом расходятся к полюсам клетки, что служит для увеличения генетического разнообразия индивидуумов.

Мейоз включает два деления – редукционное, когда вдвое уменьшается число хромосом, и эквационное – обычный митоз, когда вдвое уменьшается число хроматид (рис. 19). Редукционное деление (деление I) включает профазу I, метафазу I, анафазу I и телофазу I. В профазе I выделяют следующие стадии:

- *лептотена* (стадия тонких нитей). Становятся видимыми длинные хромосомные нити;
- *зиготена*. Начинается спаривание (конъюгация) гомологичных хромосом. Образуются биваленты – спаренные гомологичные хромосомы. Каждый бивалент состоит из четырех хроматид. Половой бивалент резко отличается от других – X- и Y-хромосомы соединены торцами. Формируются синаптонемальные комплексы – характерные структуры в местах контактов хроматид, имеющие двухслойное строение;
- *пахитена*. Происходит дальнейшая конденсация хромосом;

- *диплотена*. Распадаются синаптонемальные комплексы. Происходит разделение несестринских хроматид, которые остаются связанными друг с другом в отдельных точках, где образуются Х-образные структуры – хиазмы;

- *диакинез*. Происходит терминализация хиазм – хиазмы сдвигаются к теломерам. Происходит полное разделение гомологичных хромосом.

В конце метафазы I гомологичные хромосомы начинают расхождение к полюсам клетки. Анафаза I и телофаза I проходят аналогично анафазе и телофазе обычного митотического деления.

Эквационное деление является обычным митотическим делением гаплоидной клетки. Оно включает профазу II, метафазу II, анафазу II и телофазу II.

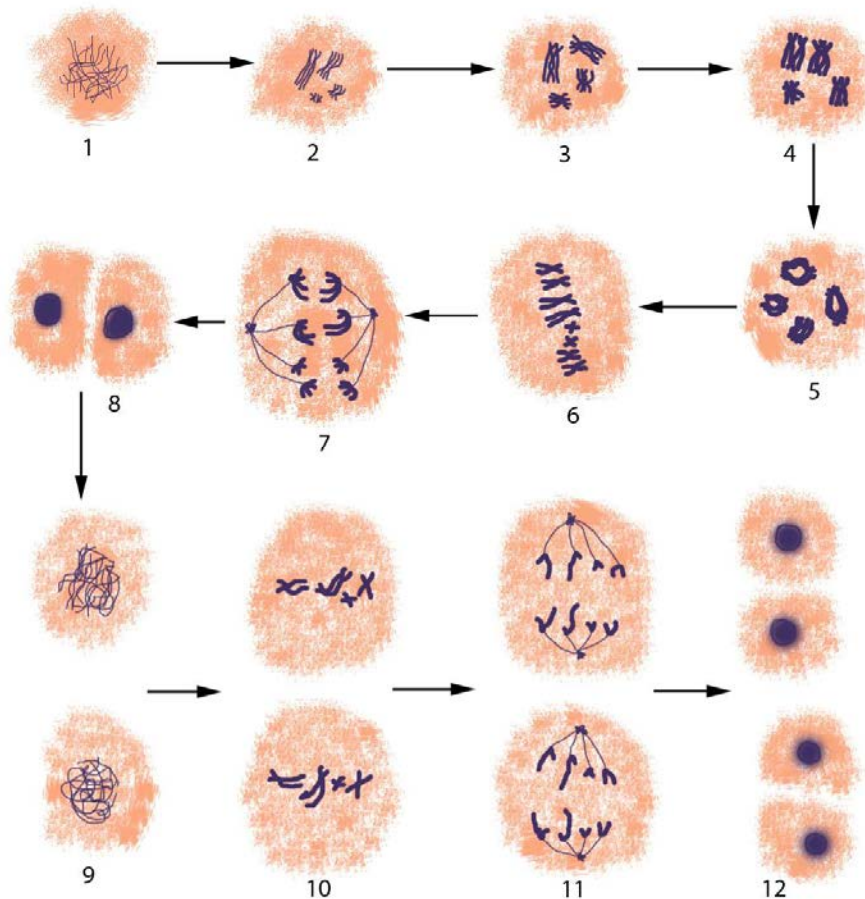


Рис. 19. Обобщенная схема мейотического деления: 1–5 – профаза I, 1 – лептотена, 2 – зиготена, 3 – пахитена, 4 – диплотена, 5 – диакинез, 6 – метафаза I, 7 – анафаза I, 8 – телофаза I, 9 – профазу II, 10 – метафаза II, 11 – анафаза II, 12 – телофаза II

У человека формирование мужских половых клеток – сперматозоидов и женских – яйцеклеток имеет существенные биологические особенности (рис. 20, 21).

Начиная с момента полового созревания (в постпубертантный период) сперматогенез у мужчин происходит постоянно. В семенниках сперматоциты – клетки, предшественники сперматозоидов, подвергаются мейотическому делению. Из одного сперматоцита получается четыре сперматозоида, каждый из которых содержит плотно упакованный гаплоидный набор хромосом и митохондрию, которая служит для выработки энергии для жгутика. Жгутик позволяет сперматозоиду быстро передвигаться в жидкой среде. Следует отметить, что от зачатия до начала мейоза в семенниках клетки – предшественники сперматозоидов – проходят большое число митотических делений, в ходе которых могут накапливаться мутации. В этом проявляется эволюционная роль мужского пола как носителя наследственной изменчивости. Так, при сравнении последовательностей ДНК хромосом шимпанзе и человека выяснилось, что быстрее всего накапливаются замены нуклеотидов именно в Y-хромосоме, что служит прекрасной иллюстрацией этого положения.

Эволюционная роль женского пола как хранителя уже установившихся наследственных изменений, как правило, имеющих адаптивную (приспособительную) ценность, выражается и в особенностях созревания яйцеклеток. Мейоз начинается в яичниках девочек на третьем месяце внутриутробного развития, когда с момента оплодотворения прошло не так много митотических делений и еще не успели накопиться мутации. До седьмого месяца делящиеся клетки находятся в стадии лептотены и зиготены. От седьмого месяца до рождения успевают пройти пахитены и диплотены, затем мейоз останавливается, образуются кариолемма и ядрышко. Эта особая стадия – диактиотена – продолжается до первой овуляции. При рождении у девочки имеется около $2,6 \times 10^6$ ооцитов, из которых большинство (около 90 %) дегенерирует. За всю жизнь женщины только около 400 ооцитов созревают полностью. В яичнике каждый ооцит окружен слоем эпителиальных клеток и двумя слоями соедини-

тельной ткани – эта структура называется фолликул. В постпубертантный период (в среднем с 12 лет) в первой половине цикла под действием лютеинизирующего гормона начинается диакinesis. В ходе редукционного деления образуется первое полярное тельце. Первое полярное тельце, как правило, позднее проходит эквационное деление. Далее мейоз проходит до метафазы II и останавливается до встречи яйцеклетки со сперматозоидом в фаллопиевой трубе. Проникновение сперматозоида стимулирует расхождение хроматид, формирование ядерной мембраны, женского пронуклеуса и второго полярного тельца. Из хроматина сперматозоида образуется мужской пронуклеус, который через несколько часов сливается с женским пронуклеусом, образуя зиготу – оплодотворенную яйцеклетку. Путем дробления зиготы образуется эмбрион.

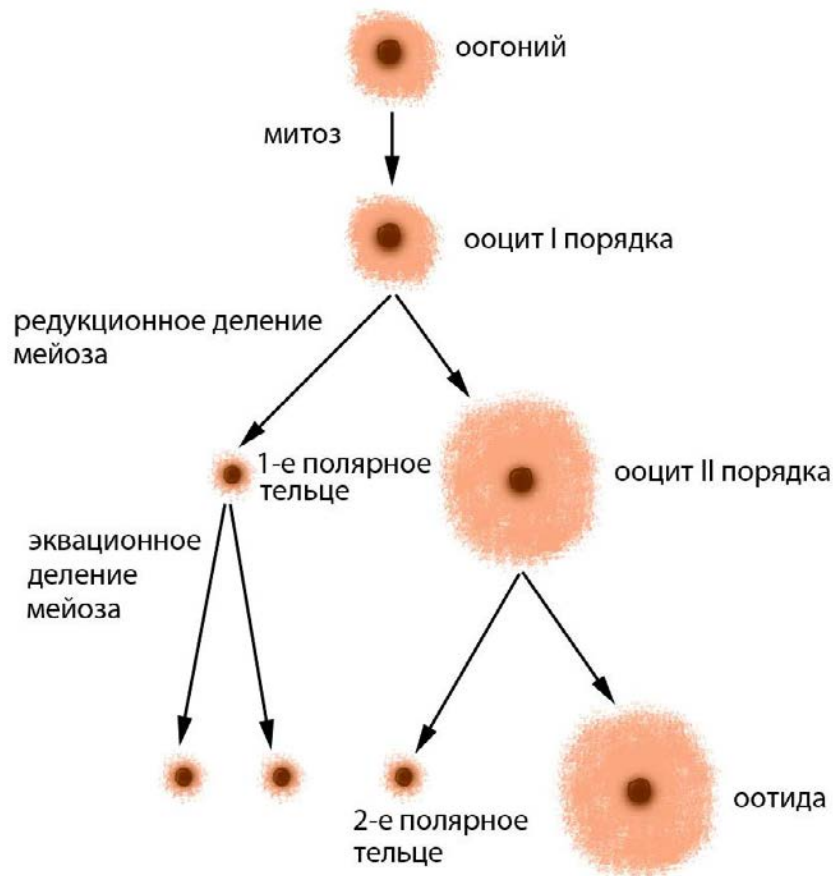


Рис. 20. Оогенез человека: оогонии – предшественники ооцитов, способные к митотическому делению; ооциты I порядка – диплоидные продукты митотического деления оогониев; ооциты II порядка – гаплоидные продукты редукционного деления ооцитов I порядка; оотида – крупная яйцеклетка, возникшая при эквационном делении ооцита II порядка

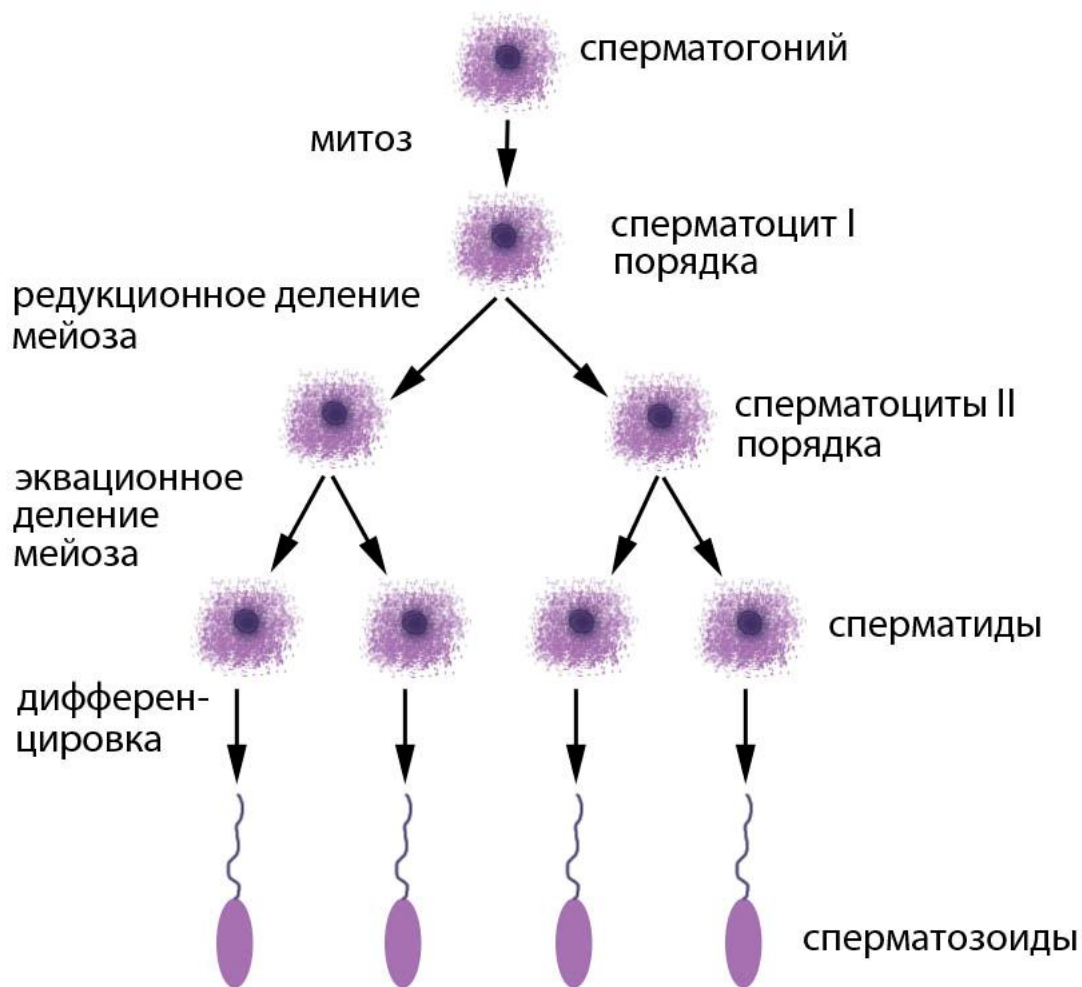


Рис. 21. Сперматогенез человека: сперматогонии – предшественники сперматоцитов, способные к митотическому делению; сперматоциты I порядка – диплоидные продукты митотического деления сперматогониев; сперматоциты II порядка – гаплоидные продукты редукционного деления сперматоцитов I порядка; сперматиды – гаплоидные продукты эквационного деления сперматоцитов II порядка

5.3. Структурно-функциональная организация хромосом

Хроматин – это вещество, из которого состоят хромосомы эукариотических клеток, представляющее собой комплекс ДНК, РНК и белков. Именно в составе хроматина происходит реализация генетической информации, а также репликация и репарация ДНК.

Основную массу хроматина составляют белки гистоны, которые ответственны не только за укладку ДНК, но выполняют и регуляторную функцию. Гистоны H2A, H2B, H3 и H4 образуют нуклеосомы — особые структуры шайбовидной формы высотой 6 нанометров и 11 нанометров в диаметре, участвующие в самом первом этапе упаковки ДНК в хромосомы (рис. 22). В состав каждой нуклеосомы входит по две молекулы каждого из указанных видов гистонов (всего восемь молекул, такие комплексы называют октамерами). Из-за того что нуклеосомы располагаются более или менее регулярно, образующаяся структура напоминает бусы (рис 23). Наиболее крупный из всех гистонов — гистон H1 — связывается с ДНК на участке между нуклеосомами (рис. 22). Компактизация и декомпактизация хроматина на уровне нуклеосомы (нуклеосомной нити) регулируется гистоном H1. При репликации — удвоении нити ДНК — нуклеосомы не распадаются, а переходят на одну из дочерних нитей случайным образом. Недостающие октамеры синтезируются заново. Самый первый уровень укладки хромосом — нуклеосомный — обеспечивает компактизацию ДНК в шесть-семь раз.

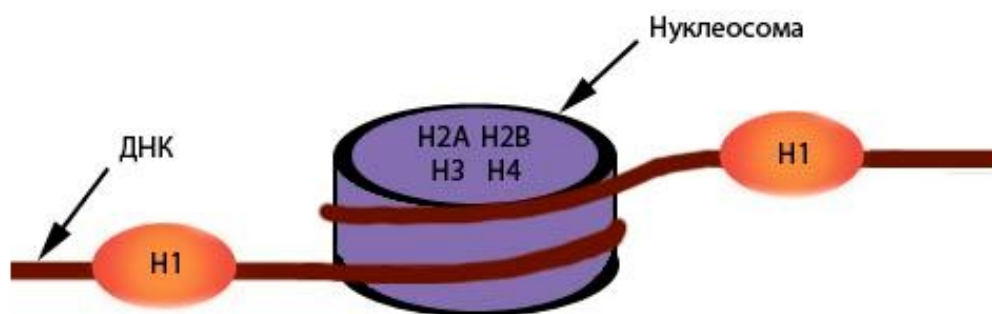


Рис. 22. Схема нуклеосомной организации хроматина. Взаимное пространственное расположение гистонов H2A, H2B, H3 и H4 не отражено



Рис. 23. Нуклеосомная нить — нуклеонема

Нить ДНК с нуклеосомами образует структуру толщиной около 30 нанометров, так называемую 30 нм фибриллу (рис. 24). Ее можно увидеть на препаратах выделенного хроматина. Удаление даже некоторой части молекул гистона Н1 приводит к распадению фибриллы до толщины 10 нанометров, что соответствует примерной толщине нуклеосомы. Это свидетельствует о том, что гистон Н1 играет ключевую роль во взаимодействии между нуклеосомами. На уровне фибриллы 30 нанометров достигается примерно сорокакратная компактизация ДНК. На таком уровне спирализации существенно снижается способность ДНК связываться с белками, участвующими в транскрипции, что приводит к уменьшению генетической активности упакованных в фибриллу 30 нанометров участков.

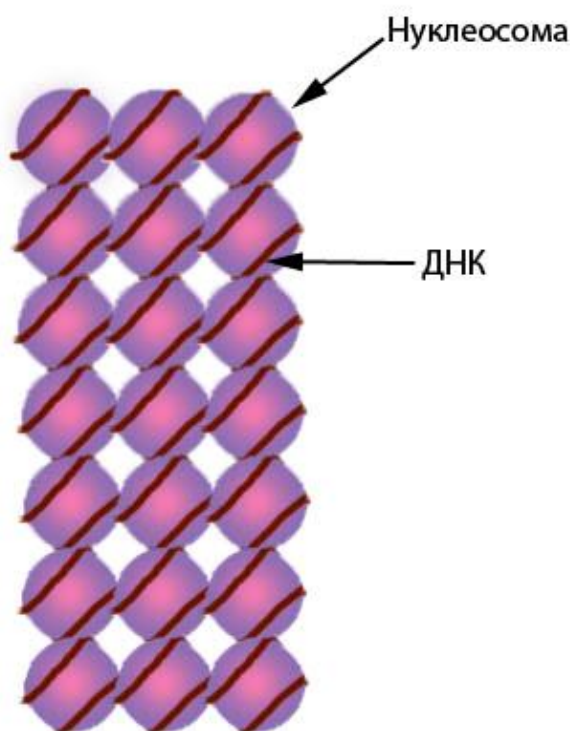


Рис. 24. Фибрилла толщиной 30 нанометров

Около 20 % всех белков хроматина составляют негистоновые белки. Именно они имеют значение для более высоких уровней компактизации хроматина. Выявляемые на препаратах клеточного ядра шарики диаметром 100 нанометров (хромоме-ры) имеют петлевую розетковидную структуру (рис. 25). Это третий уровень компактизации, обеспечивающий примерно 600–700-кратное укорочение ДНК.

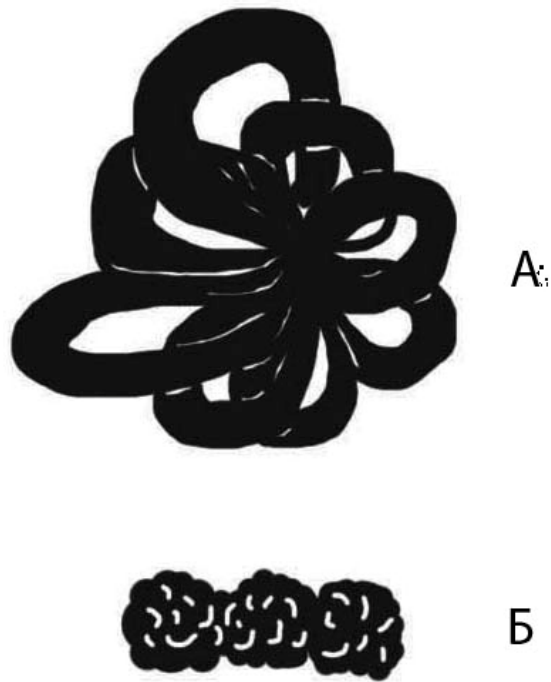


Рис. 25. Петлевой домен: А – структура в виде розетки; Б – хромонема

На препаратах митотических хромосом иногда можно увидеть спираль, образованную нитчатой хроматиновой структурой толщиной около 200 нанометров – хромонемой (рис. 25, 26). Это четвертый уровень укладки хроматина. Витки хромонемы образуют хроматиду толщиной примерно 500 нанометров, что обеспечивает укорочение ДНК примерно в 10^4 раз.

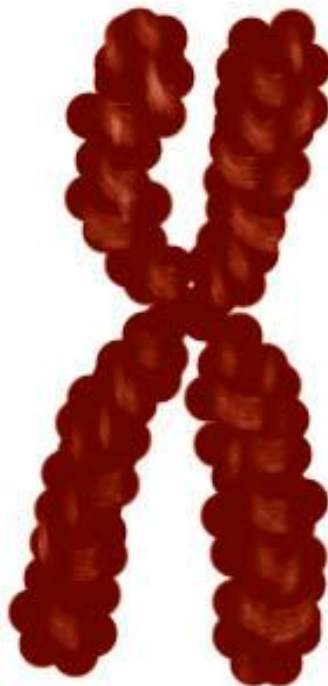


Рис. 26. Хромонемная организация митотической хромосомы

5.4. Дифференциальное окрашивание и блочная организация хромосом

При окрашивании митотических хромосом ацидофильными (т. е. связывающимися с кислотами) красителями, например эозином, или неспецифическими к нуклеотидам флуоресцентными красителями (флуорохромами – веществами, способными излучать световые волны большей длины при возбуждении светом с меньшей длиной волны) выявляется практически равномерный рисунок без исчерченности. Такая окраска называется рутинной (рис. 27).



Рис. 27. Митотические хромосомы человека, окрашенные рутинно, краситель Романовского-Гимзы – раствор эозина и метиленового синего*

Если перед окрашиванием митотические хромосомы обработать щелочными растворами, вымывающими ДНК в первую очередь из районов с низкой плотностью хроматина, можно наблюдать интенсивное окрашивание прицентромерных районов всех хромосом и практически полное интенсивное окрашивание Y-хромосомы (рис. 28). Такой подход называется С-методом дифференциального окрашивания хромосом или С-бендингом. С-положительные (интенсивно окрашенные при использовании этого метода) районы хромосом соответствуют участкам генетически инертного хроматина, или гетерохроматина. Различная степень окрашивания районов хромосом при С-окраске свидетельствует о неоднородности распределения гетерохроматина по длине хромосом.

* URL: <http://131.229.114.77/microscopy/galllm.html>)

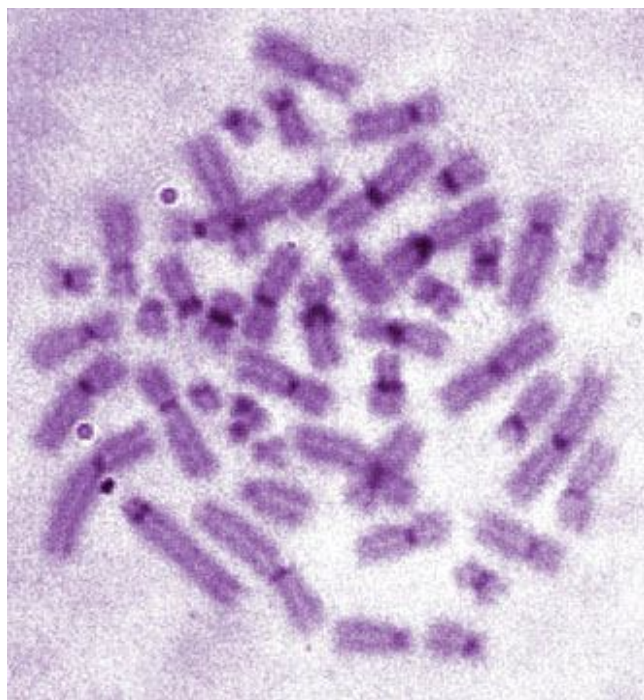


Рис. 28. Митотические хромосомы человека, окрашенные по С-методу (фото Е.Г. Нероновой)

В зависимости от степени плотности упаковки фибриллы 30 нанометров различают более конденсированный хроматин – гетерохроматин и менее конденсированный – эухроматин. Гетерохроматиновые участки очень интенсивно окрашиваются при дифференциальной С-окраске хромосом из-за большей плотности и хорошо видны под микроскопом. ДНК, находящаяся в гетерохроматине, не транскрибируется и содержит большое количество повторяющихся последовательностей. На стадии интерфазы гетерохроматин часто располагается по периферии ядра (пристеночный гетерохроматин). В эухроматине ДНК упакована сравнительно неплотно. Гены, находящиеся в эухроматиновых районах, активно транскрибируются. Плотность упаковки хроматина зависит от модификаций гистонов (метилирования, ацетилирования, фосфорилирования), в первую очередь это относится к гистону H1. Гетерохроматин у млекопитающих состоит преимущественно из высокоповторяющейся ДНК с высоким содержанием АТ-пар оснований. Таким образом, С-окраска позволяет выявлять наиболее различающиеся по своему составу и плотности районы хромосом.

Если обработку перед окрашиванием проводить более мягко, можно обнаружить поперечную исчерченность митотических хромосом. Это дифференциальная G-окраска или G-бендинг (рис. 29). G-положительные районы соответствуют более компактизованным, менее насыщенным генами участкам хромосом, которые содержат количество АТ-пар большее, чем G-отрицательные районы. Как правило, в G-положительных районах (G+-блоках) находятся тканеспецифические и стадийспецифические гены, транскрипция которых нужна не во всех клетках. В этом заключается биологическое значение блочной организации хромосом – гены, которые одинаково нужны во всех клетках, находятся в более деконденсированных участках хромосом, где ДНК более доступна для ферментов транскрипции. Для получения отчетливой G-окраски обычно используют мягкую обработку хромосом раствором трипсина с последующим окрашиванием красителем Романовского-Гимзы. По общепринятой трехбуквенной номенклатуре, которая часто используется в записи цитогенетического диагноза, такая окраска обозначается GTG (G-окраска – трипсин – Гимза).

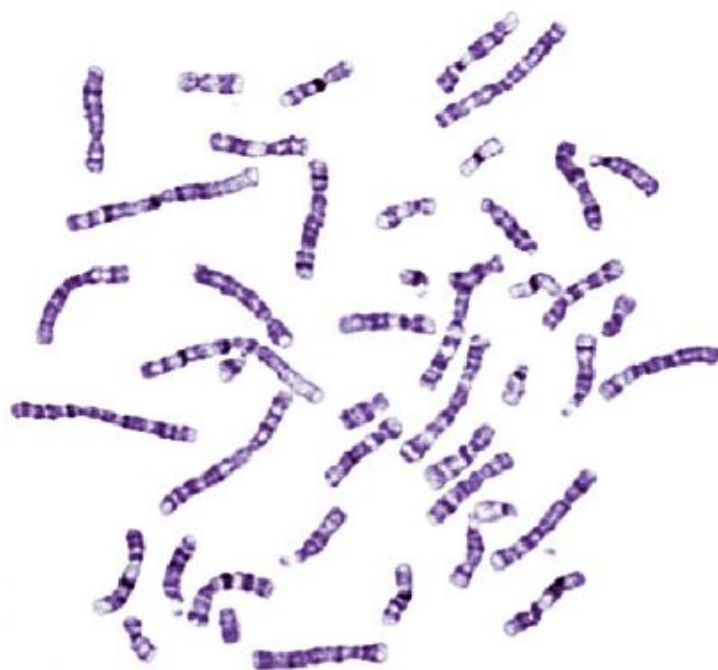


Рис. 29. Митотические хромосомы человека, окрашенные по GTG-методу*

* URL: http://www.subtelomeres.com/ClinicalDiagnosis_6.html.

G⁺-блоки также могут быть выявлены при окрашивании хромосом АТ-специфическими флуорохромами (DAPI, Хехст 33258) – это дифференциальная Q-окраска или Q-бендинг (рис. 30). АТ-богатые G-положительные районы связывают большее количество красителя, что приводит к их более интенсивной флуоресценции. Использование этого метода позволяет идентифицировать Y-хромосому даже в интерфазе, поскольку значительная ее часть состоит из необычайно АТ-богатого гетерохроматина, который при связывании с флуорохромами дает бриллиантовое свечение.

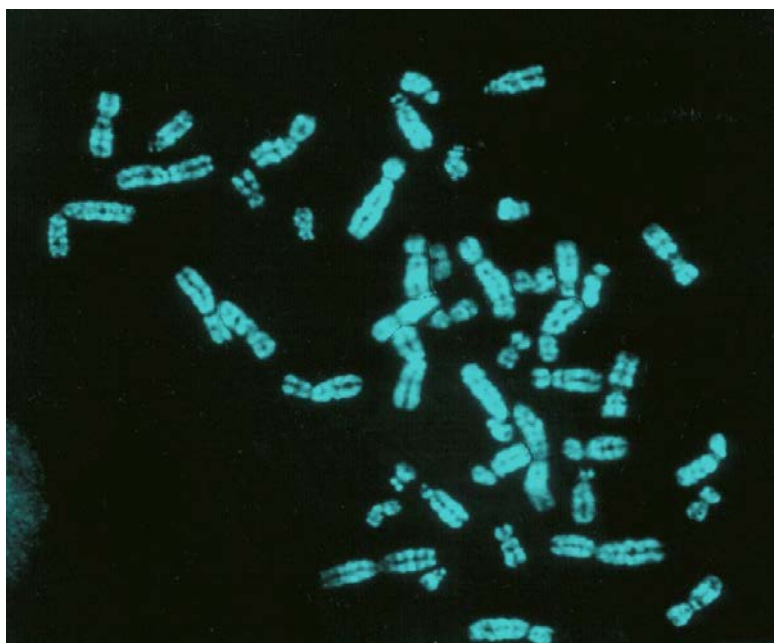


Рис 30. Митотические хромосомы человека, окрашенные по Q-методу*

Рисунок, обратный G-бендингу, получается при помощи R-метода дифференциального окрашивания путем тепловой денатурации (рис. 31). ГЦ-пары, которых больше в G-отрицательных районах хромосом, более устойчивы к этой процедуре. Подавляющее большинство G⁺-районов соответствует R- и наоборот (рис. 32). Само название этого метода происходит от английского слова reversed – обратный. R⁺-районы реплицируются в первой половине фазы S клеточного цикла, а G⁺-районы – во второй. Существуют методики выявления

* URL: <http://www.translational-medicine.com/content/3/1/21/figure/F4?highres=y>.

R-бендинга путем введения в клетки модифицированных предшественников синтеза ДНК в середине фазы S. Тогда R⁺-районы не будут содержать модифицированных нуклеотидов, а G⁺-районы – будут.

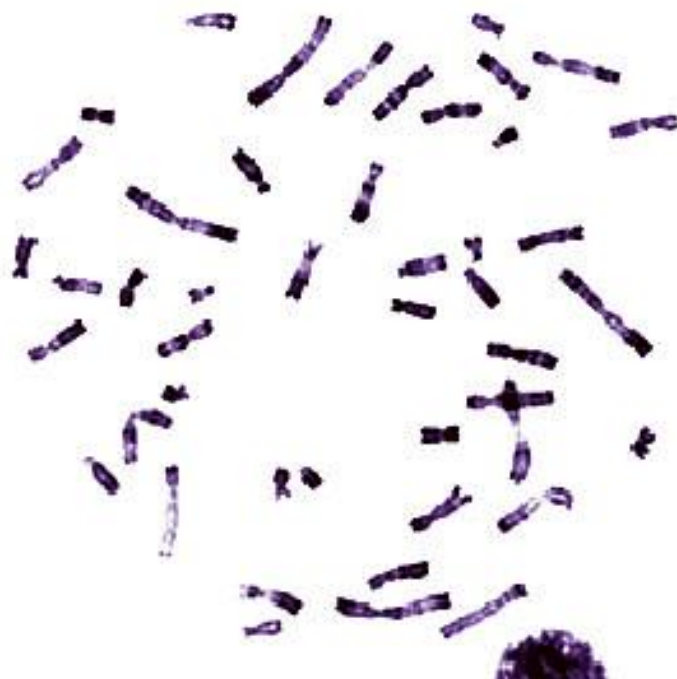


Рис. 31. Митотические хромосомы человека, окрашенные по R-методу*

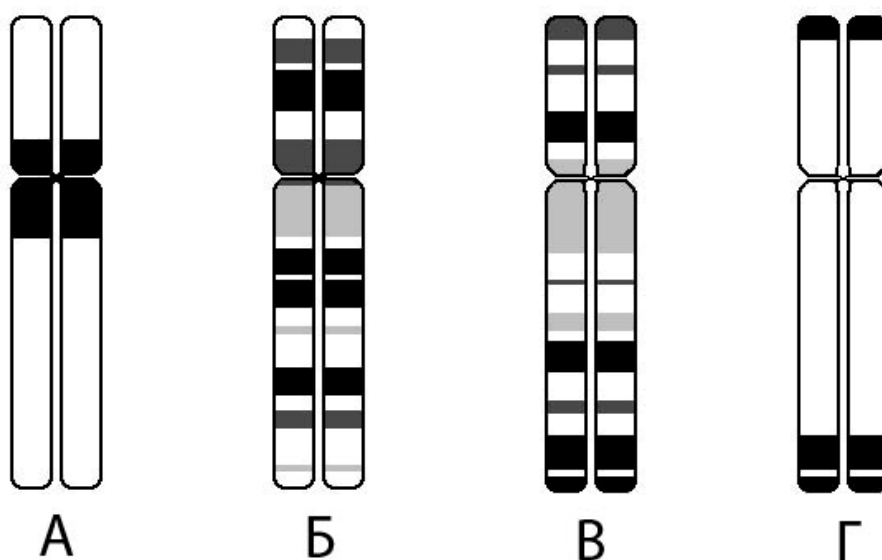


Рис. 32. Схематическое изображение одной и той же митотической хромосомы, окрашенной при помощи различных методов дифференциального окрашивания: А – С-метод, Б – G-метод, В – R-метод, Г – Т-метод

* URL: <http://www.currentprotocols.com/protocol/hg0402>

При более интенсивной тепловой обработке выявляются Т-сегменты, расположенные преимущественно в прителомерных районах хромосом (рис. 33). Их локализация совпадает с наиболее близкими к теломере R-сегментами (рис. 32). Содержание генов в Т+-районах на порядок больше, чем в среднем по длине хромосомы, и больше чем в относительно обогащенных генами R+-районах. Некоторые функциональные особенности позволяют считать Т-сегменты наиболее выраженными R-сегментами. В таких районах находится особенно много генов, связанных с наиболее важными функциями жизнеобеспечения клетки – генов домашнего хозяйства и онкогенов, мутация которых может привести к злокачественной опухоли. Это определяет особое значение теломерных районов в онкогенезе.

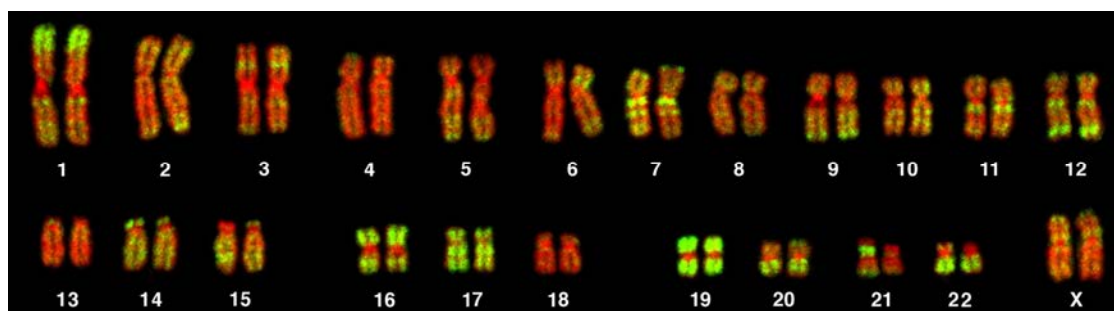


Рис. 33. Митотические хромосомы человека, окрашенные по Т-методу – флуоресцентный вариант гибридизации с использованием Алу-специфических ДНК-зондов (гл. 8)*

Районы ядрышковых организаторов (ЯОР), содержащих гены рибосомной РНК и формирующих в интерфазе ядрышки, могут быть выявлены при помощи окраски нитратом серебра (AgNO_3). Такой тип окраски называется N-бэндинг.

Для обозначения хромосомы человека используется аббревиатура HSA (от латинского видового названия *Homo sapiens*) и цифра, соответствующая номеру хромосомы. Например, HSA21 – хромосома 21 человека. В клинической практике обозначение HSA иногда опускают, поскольку ясно, что

* URL: <http://www.statemaster.com/encyclopedia/Image:PLoSBiol3.5.Fig7ChromosomesAluFish.jpg>

речь идет о человеке. Для удобства определения отдельных районов хромосом их обозначают числами, как показано на рис. 34. Последняя цифра числового обозначения указывает на определенный бэнд – полоску, выявляемую при дифференциальном окрашивании, первая цифра указывает на условную часть хромосомы, состоящую из нескольких бэндов. По умолчанию приводят обозначения сегментов, выявляемых G-методом. Теломеры обозначаются *ter*, длинное и короткое плечи – *q* и *p* соответственно.

Примеры:

HSA14p11 – район 11 короткого плеча хромосомы 14 человека;

HSAXqter – теломер длинного плеча X-хромосомы человека;

5pter-p11 – участок, ограниченный теломером и бэндом 11 короткого плеча хромосомы 5 (включает 5p11, 5p12, 5p13, 5p14, 5p15.1, 5p15.2 и 5p15.3) (рис. 34).

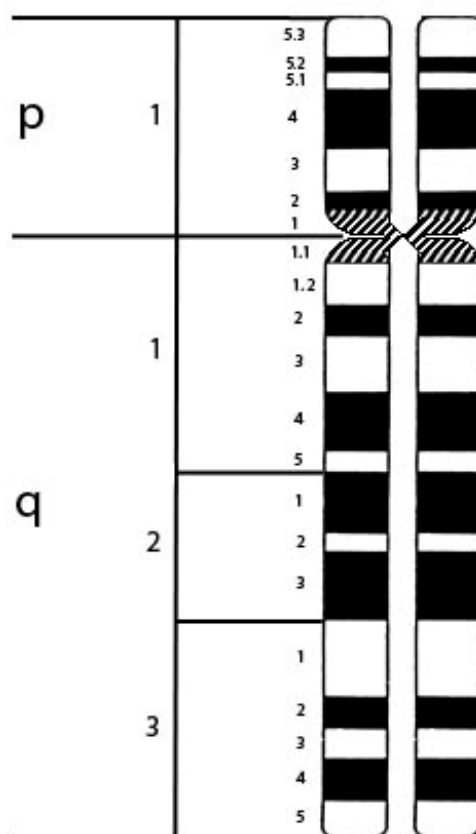


Рис. 34. Схема обозначения районов хромосом на примере хромосомы 5 человека (HSA5), дифференциально окрашенной по G-методу (уровень разрешения 400 сегментов на кариотип)

Для повышения точности цитогенетического анализа часто используют прометафазные и даже профазные хромосомы, что позволяет увеличить число распознаваемых сегментов дифференциального окрашивания до 850 и 1700 соответственно.

5.5. Гибридизация *in situ*, хромосомный пейнтинг и сравнительная геномная гибридизация (CGH)

ДНК имеет двунитевую структуру. Это дает возможность провести плавление (денатурацию), т. е. перевести ДНК в одонитевую форму, затем восстановить двунитевую структуру по принципу комплементарности с использованием одонитевой молекулы ДНК-зонда – иными словами, провести гибридизацию двух молекул ДНК. Если молекула ДНК-зонда содержит меченые нуклеотиды, ее можно выявить при помощи одной из систем детекции гибридизационного сигнала. Гибридизация нуклеиновых кислот *in situ* (от лат. *in situ* – на месте) подразумевает проведение процедуры непосредственно на цитологическом препарате хромосом, интерфазных ядер или цитоплазмы.

Изначально метод гибридизации *in situ* применялся только для локализации повторяющихся последовательностей, сгруппированных в одном или нескольких районах митотических хромосом, благодаря чему они образуют относительно крупный участок связывания (мишень) для молекул зонда.

В 80-е гг. XX столетия стали появляться сообщения о применении метода гибридизации *in situ* для локализации уникальных последовательностей на митотических хромосомах с использованием статистического анализа.

Выявление уникальных последовательностей ДНК в митотических хромосомах требует соблюдения трех условий. Во-первых, зонды должны быть надежными: четко охарактеризованными и чистыми. Во-вторых, необходимы специальные приемы, облегчающие связывание молекул зонда и мишени в хромосомах. В-третьих, неспецифическое связывание ДНК-зонда с цитологическим материалом должно быть сведено к абсолютному минимуму. Выполнение первого условия в на-

стоящее время практически не вызывает затруднений, поскольку для получения ДНК-зондов можно использовать технологию генной инженерии. Второе условие также выполнимо благодаря использованию декстран сульфата – агента, эффективно повышающего (примерно в десять раз) скорость ренатурации одноцепочечных молекул ДНК в растворе. Это способствует образованию протяженных сотовидных конгломератов одноцепочечных молекул ДНК, связанных между собой за счет случайно расположенных двухцепочечных участков.

Использование в качестве метки радиоактивных изотопов позволяет эффективно локализовать даже небольшие фрагменты ДНК – порядка 1–2 т.п.н. Основными недостатками изотопного варианта гибридизации являются относительно низкая разрешающая способность, необходимость длительной процедуры авторадииографии и технические и сложности, связанные с хранением и использованием радиоактивных веществ.

Негативные аспекты использования радиоактивной метки послужили стимулом для попыток найти эквивалентные по эффективности, но более безопасные, быстрые и дешевые методы. В результате были разработаны методы гибридизации с использованием нерадиоактивно меченых зондов, выявляемых посредством различных иммунохимических методов. Было установлено, что новая технология гибридизации обладает рядом преимуществ, к которым относится ее полная безопасность для исследователя. Другим положительным свойством нерадиоактивно меченых зондов является их химическая устойчивость в течение нескольких месяцев. Применение нерадиоактивных меток обеспечивает более высокую разрешающую способность, чем работа с изотопами, а в ряде случаев повышает уровень информативности. Неизотопная гибридизация позволяет картировать (т. е. определять местоположение на хромосоме) уникальные гены размером около 1 т.п.н. Наконец, результаты гибридизации можно анализировать сразу после проведения эксперимента. Таким образом, преимущества нерадиоактивного мечения зондов заключаются в высокой разрешающей способности, точности, воспроизводимости, дешевизне и безопасности.

Чувствительность данного метода зависит от размера гена, количества его копий, специфической активности зонда, а также от количества молекул флуорохрома, присутствующих в гибриде на заключительной стадии эксперимента.

Неизотопный вариант гибридизации *in situ* позволяет использовать несколько ДНК-зондов, меченных разными агентами, на одном цитологическом препарате (многоцветная гибридизация). Такой подход используют для тонкого интерфазного картирования с разрешающей способностью до 100 т.п.н.

Повышению специфичности метода служит супрессия (подавление) неспецифической гибридизации путем добавления в гибридизационную смесь небольшого количества конкурирующей ДНК. Такая процедура необходима при использовании в качестве зондов больших геномных последовательностей ДНК.

В настоящее время наиболее часто используется метод биотинового мечения. Его принцип основан на сильном взаимодействии биотина с белком авидином вследствие их высокого сродства. Молекула авидина потенциально может образовать четыре химические связи, поэтому после связывания его с биотином три связи остаются свободными, что используется при детекции сигнала гибридизации.

Приготовление хромосомных препаратов производится согласно существующим методикам. На следующем этапе метафазные хромосомы подвергаются обработке РНК-азой с целью удаления связанной РНК. Далее ДНК зондов и хромосом денатурируют, создавая одноцепочечные структуры. Хромосомные препараты инкубируют с зондом в течение определенного времени. Затем удаляют избыток меченой ДНК, не связавшейся с денатурированной ДНК хромосом, посредством специальной отмывки препаратов. Последним этапом эксперимента является детекция сайтов гибридизации. Суть его сводится к следующему: ДНК, содержащая в своем составе биотин, легко распознаваема при контакте ее с авидином (стрептавидином). Последний, в свою очередь, может быть выявлен флуоресцентно. Такой подход в наше время является наиболее распространенным и называется флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH – fluorescent *in situ* hybridization) (рис. 35).

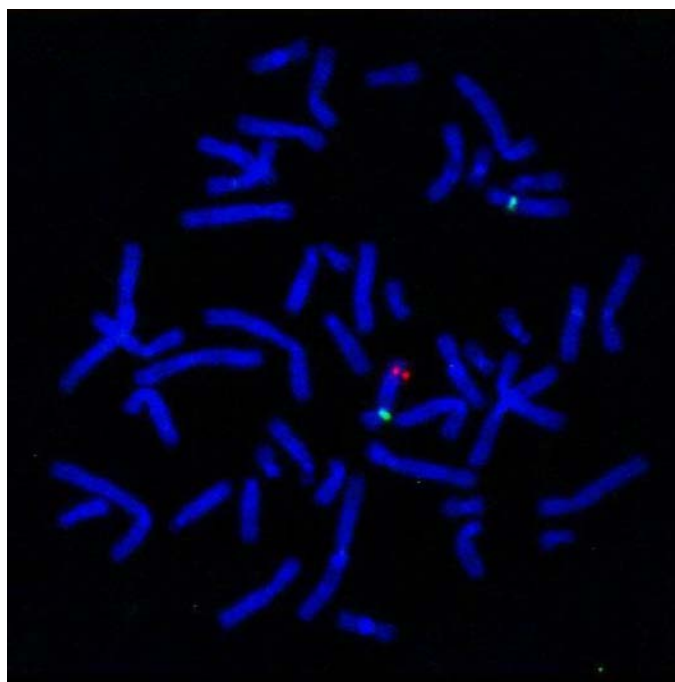


Рис. 35. Двухцветный вариант флуоресцентной гибридизации *in situ**

В последние годы для картирования геномов высших эукариот используют протяженные ДНК-зонды величиной 10–150 т.п.н., которые, как правило, клонируют в космидах (гл. 7) или в искусственных хромосомах дрожжей или бактерий. Применение перекрывающихся протяженных ДНК-клонов (контигов) позволяет связать хромосомный и молекулярный уровни картирования геномов.

Для выявления тонких хромосомных перестроек и для быстрой идентификации хромосом применяют метод хромосомного пэйнтинга — в этом случае в качестве зонда для гибридизации используют последовательности из хромосомоспецифических библиотек. Одновременно можно использовать несколько хромосомоспецифических зондов и получить изображение, где каждая хромосома представлена своим цветом (рис. 36). Присутствие фрагментов другого цвета на хромосоме будет говорить о хромосомной перестройке.

* URL: <http://qwickstep.comsearchchromosome-12.html>

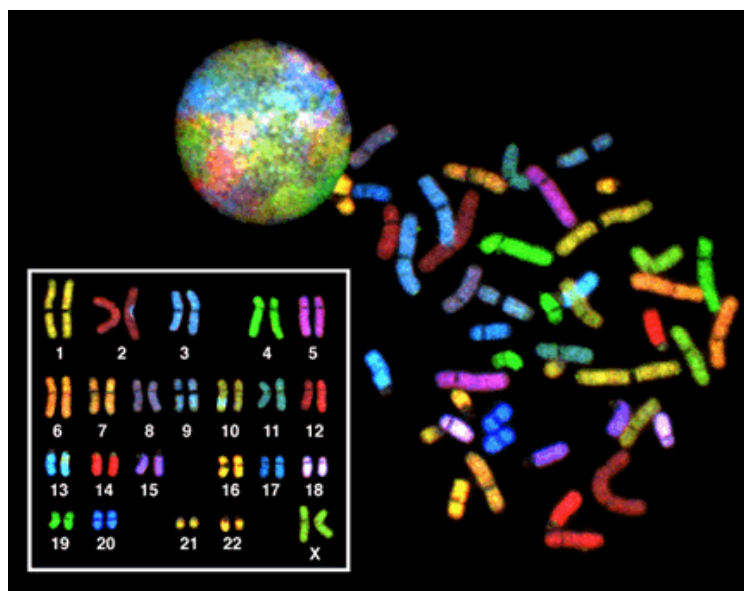


Рис. 36. Хромосомный пейнтинг
(мультиFISH или спектральный анализ кариотипа)*

Для выявления тонких хромосомных перестроек, размер которых может лежать за пределом разрешающей способности микроскопа, используют метод сравнительной геномной гибридизации (CGH – comparative genomic hybridization). Суть метода заключается в количественной оценке ДНК, связывающейся с молекулой короткого зонда на биочипе (рис. 37). Все хромосомы и отдельные районы представлены специфическими только для них ДНК-зондами, закрепленными на стекле. Координаты каждой такой последовательности введены в специальную программу. ДНК от анализируемого индивидуума и контрольный образец метят разными флуорохромами и гибридизуют на биочипе. После отмывок сканер считывает уровень флуоресценции в отдельных точках на биочипе. Этот уровень прямо пропорционален количеству связавшейся ДНК с определенным зондом, локализация которого известна. Снижение вдвое уровня флуоресценции в местах расположения зондов из определенного района по сравнению с нормальной клеткой свидетельствует о гетерозиготности по делеции (утрате) данного района. У гомозигот по делеции флуоресценция зондов из делетирован-

* URL: http://people.musc.edu~hazardsWebBioInformaticsSKY_CGH.htm

ных районов отсутствует вовсе. У гетерозигот по дупликации (удвоению хромосомного района) флуоресценция зондов из дуплицированного района в полтора раза выше, чем у кариотипически нормальных индивидуумов.

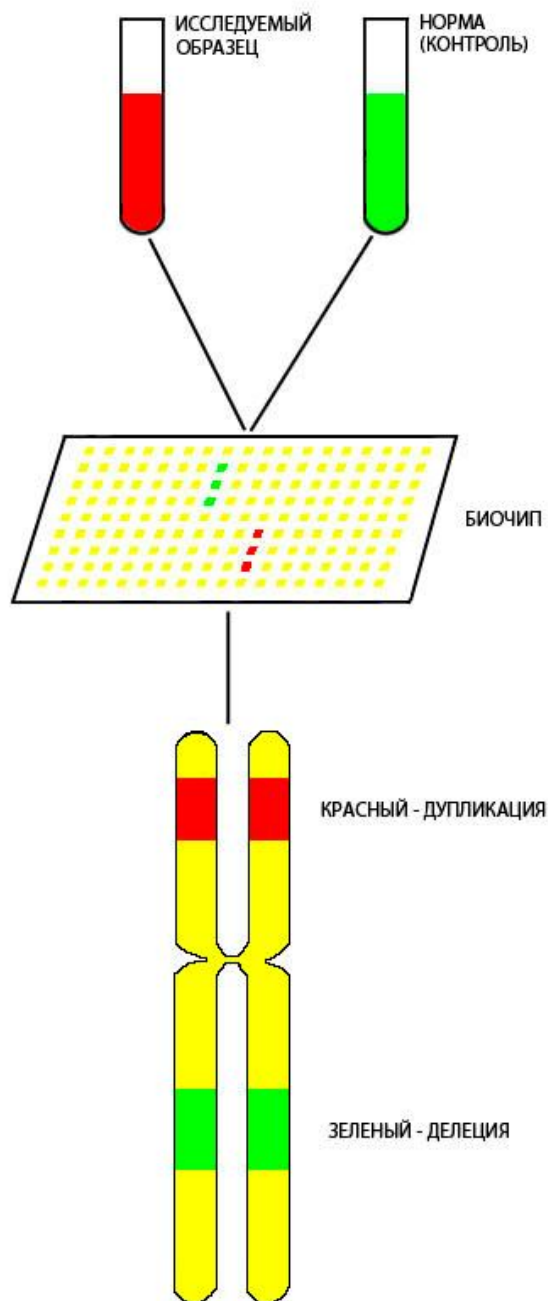


Рис. 37. Схема метода сравнительной геномной гибридизации (CGH)

5.6. Теория старения в связи с динамикой структуры теломеры

Теломеры – это концевые участки хромосом (рис. 15). Теломерные участки хромосом выполняют защитную функцию, они неспособны соединяться с другими хромосомами или их фрагментами.

У большинства эукариот теломерные последовательности ДНК представляет собой короткие тандемные повторы (повторы одинаково ориентированных единиц). В теломерных участках хромосом ДНК вместе с белками, специфически связывающимися с теломерными повторами, образует нуклеопротеидный комплекс – конститутивный (структурный) теломерный гетерохроматин. Теломерные повторы – весьма консервативные последовательности. У всех позвоночных, в том числе у человека, они представляют собой многократные повторы шести нуклеотидов – ТТАГГГ.

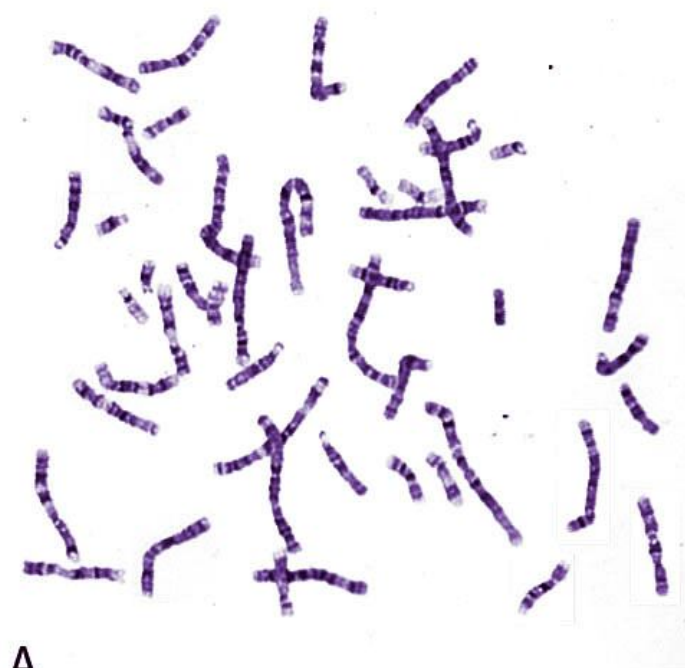
Из-за того что ДНК-полимераза не способна синтезировать линейную молекулу ДНК до самого конца, с каждым циклом деления теломеры клетки укорачиваются. Данный феномен называется концевой недорепликацией и считается одним из важнейших факторов биологического старения. Однако вследствие этого явления теломеры должны укорачиваться очень медленно: по 3–6 нуклеотидов за один акт репликации. Известно ограничение числа делений одной дифференцированной клетки – предел Хейфлика, которое у человека равно 52. Таким образом, за это число делений теломеры могут стать короче всего на 156–312 нуклеотидов, что совершенно не существенно, учитывая многократное повторение теломерной последовательности ТТАГГГ. Существует эпигенетическая теория старения, согласно которой постепенная утрата маркеров репрессии (подавления) неактивного хроматина приводит к активации перемещения мобильных элементов. Клетка запускает механизмы удаления вызванных этими перемещениями повреждений, что приводит к укорочению теломер в десятки и сотни раз.

В стволовых и половых клетках активно работает особый фермент – теломераза, который при помощи собственной РНК-матрицы достраивает теломерные повторы и удлиняет теломеры. Однако в большинстве дифференцированных клеток теломераза заблокирована, что приводит к неминуемому укорочению теломер и повышению вероятности мутаций расположенных в Т-дисках онкогенов и генов домашнего хозяйства.

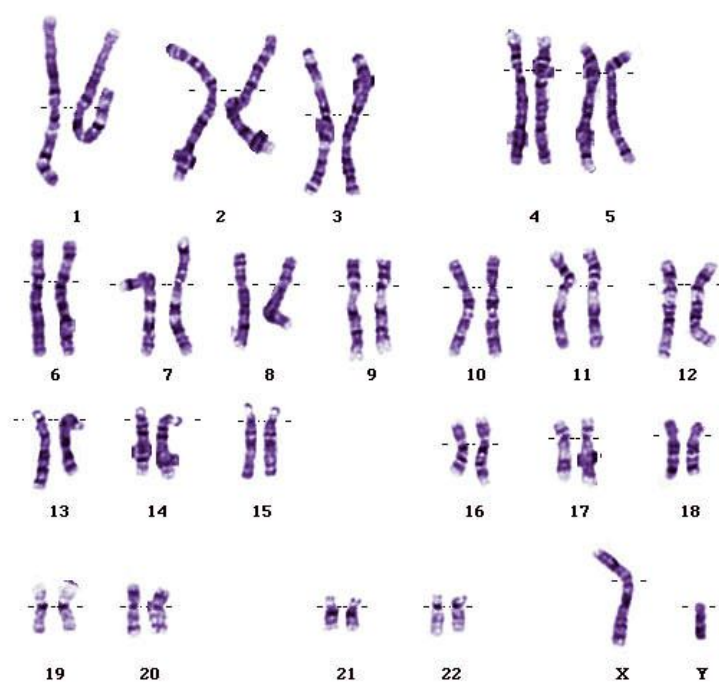
5.7. Нормальный кариотип человека

Кариотип человека в норме состоит из 23-х пар хромосом, которые располагают под номерами в порядке убывания их линейных размеров (рис. 38). Аутосомы (все хромосомы кроме половых) образуют одинаковый набор у обоих полов. Мужской набор половых хромосом XY, женский – XX. Кариотип нормального мужчины – 46, XY, нормальной женщины 46, XX. Как и у всех млекопитающих, гетерогаметным полом у человека является мужской. Y-хромосома состоит преимущественно из гетерохроматина. Небольшая по длине эухроматиновая часть содержит 397 генов (при общем числе генов у человека более 35000, для одной из самых коротких хромосом это немало). Для компенсации дозы генов в клетках женского организма происходит инактивация одной из X-хромосом. X-хромосома содержит 1606 генов. Примечательно, что в ней остается небольшая неинактивированная часть, содержащая примерно четверть генов, что уравнивает дозу работающих генов у обоих полов (примерно 400 генов половых хромосом представлено двумя копиями).

Хромосомы человека принято условно подразделять на восемь групп, которые обозначают латинскими буквами от А до G. Такое подразделение вызвано тем, что не всегда можно точно определить номер хромосомы. Распределение хромосом по группам было выполнено на основании их морфологических особенностей, видимых при рутинном окрашивании.



A



Б

Рис. 38. Нормальная метафазная пластинка (А) и раскладка (Б) дифференциально окрашенных по G-методу хромосом человека*

* URL: <http://homepage.mac.com/wildlifeweb/cyto/human/index.html>

Группа А включает хромосомы 1, 2 и 3 – это метацентрические и субметацентрические хромосомы. Хромосома 1 – самый большой метацентрик в кариотипе. Хромосома 2 является самой крупной субметацентрической хромосомой. Метацентрическая хромосома 3 отличается примерно на 1/5 по длине от хромосомы 1, и поэтому легко может быть идентифицирована. В проксимальном (находящемся ближе к центромере) районе длинного плеча хромосомы 3 при использовании Q-окраски является очень яркий сегмент, который также позволяет безошибочно определить эту хромосому.

Группа В включает хромосомы 4 и 5 – крупные субметацентрики. Отличить их друг от друга при рутинном окрашивании невозможно.

Группа С представлена хромосомами 6–12. В эту же группу входит половая X-хромосома. Все хромосомы этой группы – метацентрики среднего размера. Индивидуально различить их можно только при помощи G-, R- или Q-окраски.

Группа D включает три пары акроцентрических хромосом средней длины – с 13 по 15. Все они содержат вторичную перетяжку – место локализации ЯОР (ядрышкообразующих районов), отделяющую небольшой по длине спутник от остальной части короткого плеча. Размеры спутников заметно варьируют у разных индивидуумов. Иногда наблюдаются два спутника.

К группе Е относят короткие метацентрические и субметацентрические хромосомы с 16 по 18. Хромосома 16 – метацентрик, ее длина составляет около трети от длины хромосомы 1. Хромосомы 17 и 18 близки по центромерному индексу (около 0,30) и несколько (5–10 %) различаются по длине.

Группа F объединяет две маленькие метацентрические хромосомы 19 и 20, практически неразличимые без дифференциальной окраски.

Группа G включает маленькие акроцентрические хромосомы 21 и 22. К этой группе относят и половую Y-хромосому, которая отличается от других хромосом этой группы положением хроматид длинного плеча – у Y-хромосомы они расположены близко, а у хромосом 21 и 22 – широко расставлены. Размер Y-хромосомы варьирует в широких пределах за счет изменения

размеров гетерохроматинового блока, не оказывающего существенного влияния на фенотип. Такая вариабельность видна даже в интерфазных ядрах при окрашивании АТ-специфическими флуорохромами. В коротких плечах хромосом 21 и 22 обнаруживается вторичная перетяжка – подобно хромосомам группы D они содержат ЯОРы. Рисунки дифференциальной исчерченности хромосом 21 и 22 существенно различаются, что позволяет проводить их индивидуальную идентификацию.

5.8. Аномалии числа хромосом

Мутации – наследуемые изменения генетического аппарата. Обычно их подразделяют на геномные, хромосомные и генные. В двух последних случаях изменения происходят внутри хромосом или внутри отдельных генов соответственно. Под геномными мутациями понимают изменения числа хромосом. Если изменение кратно гаплоидному числу хромосом (у человека – 23), то такие геномные мутации относят к полиплоидиям, если изменение не кратно гаплоидному числу хромосом (например, одна дополнительная или одна недостающая хромосома) – к анеуплоидиям.

Согласно общепринятой международной номенклатуре кариотип принято записывать следующим образом: вначале записывают общее число хромосом, затем – половые хромосомы. При нормальном кариотипе этим и ограничиваются, при наличии хромосомных нарушений их описывают при помощи специальных обозначений, которые будут рассмотрены при изложении материала о каждом из них.

Пример

46, XX – нормальная женщина;

46, XY – нормальный мужчина.

Если не все клетки организма имеют одинаковый кариотип, то такие организмы называют мозаичными или мозаиками. Обычно фенотипическое проявление наблюдается у мозаиков, если мутантных клеток больше четверти. На этом наблюдении основан широко распространенный в диагностической практике

метод анализа хромосом. На первом этапе анализируют 11 метафазных пластинок – это число соответствует рассчитанному числу клеток, где при 25-процентном мозаицизме статистически достоверно присутствует более одной мутантной клетки. Если мутантных клеток не обнаружено, то индивидуума считают кариотипически нормальным. Если среди одиннадцати проанализированных клеток две и более окажутся мутантными – диагностируется мозаицизм. Если только одна клетка окажется мутантной – анализируют еще шесть клеток. Если среди них не находят ни одной мутантной (причем именно с такой мутацией, как и у первой выявленной мутантной клетки) – индивидуум считается кариотипически нормальным, а обнаружение первой мутантной клетки считают случайным. Если среди проанализированных шести клеток находят еще одну мутантную с той же мутацией, то в анализ берут еще шесть клеток. Анализ продолжают до тех пор, пока не обнаружат две или более мутантных клетки среди очередной проанализированной серии. Тогда ставят диагноз – мозаицизм. Если в очередной серии проанализированных клеток все они будут иметь нормальный кариотип – индивидуума считают кариотипически нормальным.

Из всех возможных вариантов полиплоидов у человека описаны только триплоиды – обычно это выкидыши на разных стадиях внутриутробного развития. Иногда живорожденные дети-триплоиды смогли прожить несколько часов или дней, причем большинство из них были мозаиками. Известны отдельные случаи выживания мозаиков по триплоидии. Фенотипически триплоидия проявляется прежде всего в пузырном перерождении плаценты. Характерные для многих хромосомных аномалий признаки – умственная отсталость, неполное зарастание родничка, локальные пороки развития – наблюдаются и при этом типе геномных мутаций.

Наиболее распространенный случай анеуплоидии – трисомия (наличие одной добавочной хромосомы) по хромосоме 21 или *синдром Дауна*. Эта аномалия встречается с частотой 1 на 700 новорожденных. Риск рождения ребенка с синдромом Дауна повышается с увеличением возраста матери. В последние годы частота рождения детей с этим синдромом в развитых

странах снижается по причине использования пренатальной (дородовой) диагностики. У больных отмечается задержка роста и развития, умственная отсталость, врожденный порок сердца, снижение иммунитета, снижение мышечного тонуса. Внешне их легко узнать – широкое лицо, раскосые глаза с эпикантусом (складкой верхнего века), короткий нос, большой складчатый язык (рис. 39). Как и для всех хромосомных аномалий человека, для синдрома Дауна характерна высокая изменчивость фенотипических проявлений – у разных индивидуумов может наблюдаться разная выраженность отдельных симптомов, а некоторые из них могут отсутствовать вовсе. Обычно больные миролюбивы, неплохо проходят социальную адаптацию – некоторые даже образуют семьи. Средняя продолжительность жизни – 49 лет. Больные мужчины бесплодны, у некоторых женщин могут быть дети как с синдромом Дауна, так и нормальные. Запись кариотипа с трисомией по хромосоме 21 выглядит так: 47, XX, +21 или 47, XY, +21. Кроме дополнительной хромосомы 21 причиной этого синдрома могут быть внутрихромосомные перестройки с ее участием.

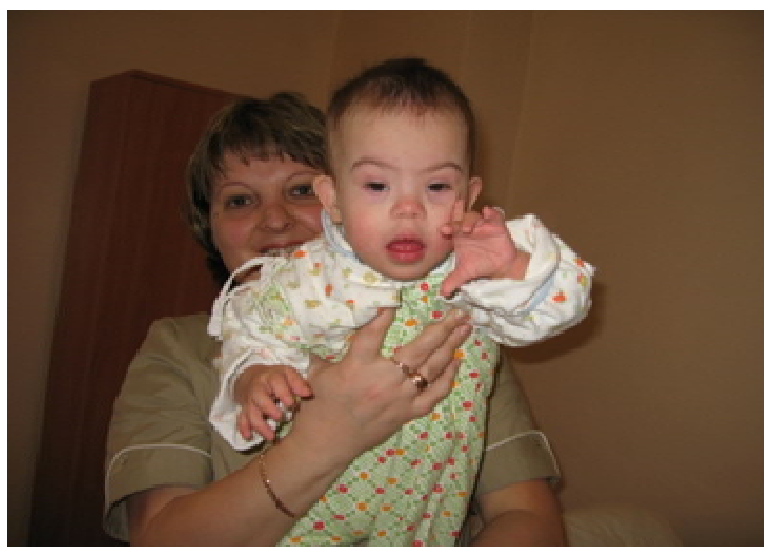


Рис. 39. Ребенок с синдромом Дауна (фото С.В. Дундуковой)

Другой пример анеуплоидии с множественными пороками развития – трисомия по хромосоме 18 или *синдром Эдвардса*. Это второе по частоте встречаемости хромосомное заболевание после синдрома Дауна – 1 на 7000. Кариотип больных де-

вочек и мальчиков соответственно 47, XX, +18 и 47, XY, +18. Больные рождаются с низким весом (около 2 кг), у них отмечается задержка роста и развития, умственная отсталость, широкие роднички при рождении и открытые швы черепа, грудная клетка шире и короче нормальной, нижняя челюсть и ротовое отверстие маленькие (рис. 40). Глазные щели узкие и короткие, слуховые отверстия деформированы и иногда отсутствуют. Отмечаются пороки сердца и крупных сосудов, гипоплазия мозжечка и мозолистого тела. До годовалого возраста доживает 5–10 %, все выжившие – глубокие олигофрены.



Рис. 40. Ребенок с синдромом Эдвардса*

Синдром Патау – трисомия по хромосоме 13 в различных популяциях человека встречается с частотами от 1 на 14000 до 1 на 7000, кариотип – 47, +13. Есть связь возраста матери и риска рождения ребенка с этим синдромом, хотя она не такая строгая, как в случае синдрома Дауна. При вынашивании плода с синдромом Патау у половины беременных наблюдается многоводие. Дети рождаются с небольшим весом – около 2,5 кг, имеют умеренную микроцефалию, низкий скошенный лоб, су-

* URL: <http://medgen.genetics.utah.edu/photographs/diseases>

женные глазные щели, расстояние между которыми уменьшено, помутнение роговицы, микрофтальмию, колобому, расщелину верхней губы и нёба, деформированные ушные раковины, полидактилию (рис. 41). По причине множественных врожденных аномалий большинство больных (до 95 %) умирает в возрасте до года. При должном уходе около 15 % выживших после достижения годовалого возраста имеют продолжительность жизни 5 лет, 2–3 % доживают до 10 лет.



Рис. 41. Ребенок с синдромом Патау*

Синдром Варкани – трисомия по хромосоме 8 – описан преимущественно у мозаиков 46 / 47, +8. Полная трисомия по хромосоме 8, как правило, летальна. Частота встречаемости среди новорожденных – 1 на 5000. Дети рождаются доношенными, возраст матери не влияет на вероятность рождения ребенка с этим синдромом. Характерны умственная отсталость (97,5 % случаев), выступающий лоб, косоглазие, глубоко посаженные

* URL: <http://ptgandg.com/peter.htm>

глаза, эпикантус, гипертелоризм (увеличенное расстояние между парными органами) глаз и сосков, высокое нёбо (иногда расщелина), толстые губы, вывернутая нижняя губа, аномалии скелета, аплазия мозолистого тела, пороки мочевой системы, узкий таз, узкие плечи (рис. 42). Со временем развиваются гидроцефалия, паховая грыжа. Продолжительность жизни – не более 17 лет.

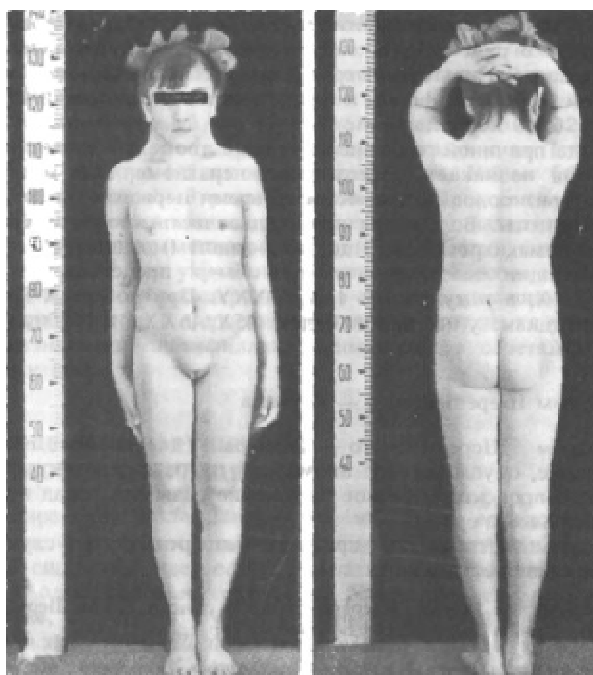


Рис. 42. Ребенок с синдромом Варкани (мозаицизм по трисомии 8)*

Анеуплоидии по половым хромосомам также достаточно часто встречаются в популяциях человека. Моносомия (отсутствие одной из гомологичных хромосом) по X-хромосоме или *синдром Шерешевского-Тёрнера* встречается с частотой 1 на 1500. Кариотип – 45, X. Пол ребенка с моносомией по X-хромосоме женский, так как у всех млекопитающих мужской пол определяется наличием Y-хромосомы, а не количеством X-хромосом. Вынашивание девочек с этим синдромом часто

* URL: <http://web.coehs.siu.edu/GrantsTRISkidsofTRISDateOrder.html>

проходит с токсикозом и угрозой выкидыша, а роды бывают преждевременными и патологическими. Во второй половине беременности происходит инволюция (обратное развитие) половых клеток, и к моменту рождения у ребенка резко уменьшено количество фолликулов или они вовсе отсутствуют. Следствиями недоразвития гонад являются недостаточность женских гормонов, аменорея (отсутствие менструаций) и бесплодие. Для больных девочек характерен низкий рост, отставание в развитии, широкая бочкообразная грудная клетка, короткая шея, крыловидные складки на боковых поверхностях шеи, деформация локтевых суставов (рис. 43). Часто встречаются пороки сердца и крупных сосудов, аплазия фаланг пальцев, склонность к ожирению и гипертензия. Молочные железы у большинства больных неразвиты, соски расположены низко. Матка недоразвита, вход во влагалище воронкообразный, малые половые губы, клитор и девственная плева недоразвиты, большие половые губы по виду напоминают мошонку. При этом синдроме проявляются все имеющиеся сцепленные с полом рецессивные мутации.



*Рис. 43. Шестнадцатилетняя девушка с синдромом Шерешевского-Тёрнера**

* URL: <http://lekmed.ru/infoarhivyendokrinologiya-56.html>

Синдром тройной X-хромосомы встречается с частотой 1 на 700. Все больные – внешне нормальные женщины с кариотипом 47, XXX. Иногда встречаются две или более дополнительные X-хромосомы. Умственная отсталость и алалия отмечаются у 75 % больных, часто наблюдается недоразвитие фолликулов, ранний климакс и бесплодие.

Одна или несколько дополнительных X-хромосом у представителей мужского пола – *синдром Клайнфельтера*. Возможны кариотипы: 47, XXY; 48, XXYY; 48, XXXY; 49, XXXXY; 49, XXXYY). Частота встречаемости 1 на 500–700 новорожденных мальчиков. Для больных характерны высокий рост, длинные конечности при сравнительно коротком туловище, гинекомастия, евнухоидизм, бесплодие, повышенное содержание женских гормонов, ожирение, психические нарушения, склонность к асоциальному поведению (рис. 44).



Рис. 44. Мужчина с синдромом Клайнфельтера*

* URL: <http://dermline.ru/htm/23/233709.htm>.

Синдром дополнительной Y-хромосомы (кариотип 47, XYY) встречается с частотой 1 на 500. Клинические проявления практически не выражены. Часто встречаются высокий рост, атлетическое телосложение, несколько повышенный уровень агрессивности, неадекватная реакция на критику, склонность к импульсивным поступкам, любовь к риску и приключениям. Синдром с большей, чем в среднем по популяции, частотой встречается среди осужденных за насильственные преступления, представителей опасных профессий и любителей экстремальных видов спорта.

5.9. Внутрихромосомные перестройки

Кроме аномалий числа хромосом – геномных мутаций – причиной хромосомной патологии могут быть и внутрихромосомные перестройки или абберации. Их подразделяют на несколько типов:

- делеция – утрата участка хромосомы (обозначается «del») (рис. 45);
- дефишенси – концевая делеция (обозначается знаком разрыва «:») (рис. 46);
- дупликация – удвоение участка хромосомы (обозначается «dup») (рис. 47);
- амплификация – многократное повторение участка хромосомы (обозначается «amp») (рис. 48);
- инсерция – вставка дополнительного хромосомного района (обозначается «ins») (рис. 49);
- парацентрическая инверсия – поворот на 180° участка хромосомы, не содержащего центромеры (обозначается «inv») (рис. 50);
- перичцентрическая инверсия – поворот на 180° участка хромосомы, содержащего центромеры (обозначается «inv») (рис. 51);
- транслокация – перенос участка с одной хромосомы на другую (обозначается t и знаком разрыва-слияния «::») (рис. 52);

- реципрокная транслокация – обмен участками между не-гомологичными хромосомами (обозначается «гср») (рис. 53);
- робертсоновская транслокация – слияние двух акроцентрических хромосом с образованием одной (суб)метацентрической (рис. 54).

Механизм, как правило, такой: происходит обмен плечами между двумя акроцентрическими хромосомами, приводящий к появлению двух (суб)метацентрических хромосом, состоящих только из длинных плеч, вовлеченных в обмен акроцентриков, и только коротких. Поскольку хромосома, составленная из коротких плеч, исчезает в ходе первых же после возникновения перестройки клеточных делений, единственным результатом робертсоновской транслокации является появление новой (суб)метацентрической хромосомы. Обозначается «rob».

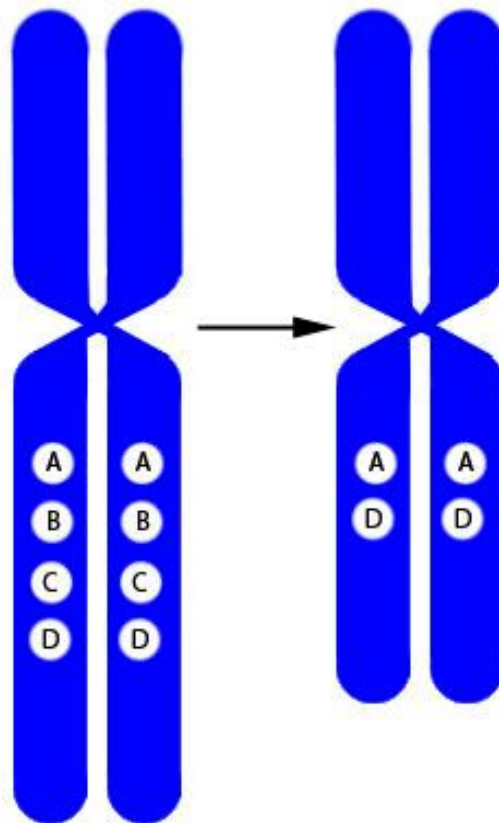


Рис. 45. Схема делеции

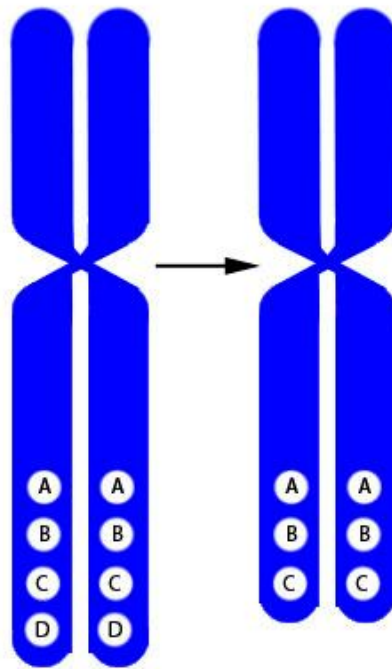


Рис. 46. Схема дефишенси

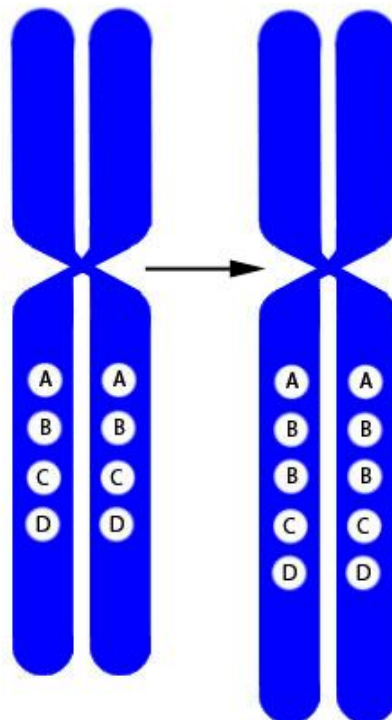


Рис. 47. Схема дупликации

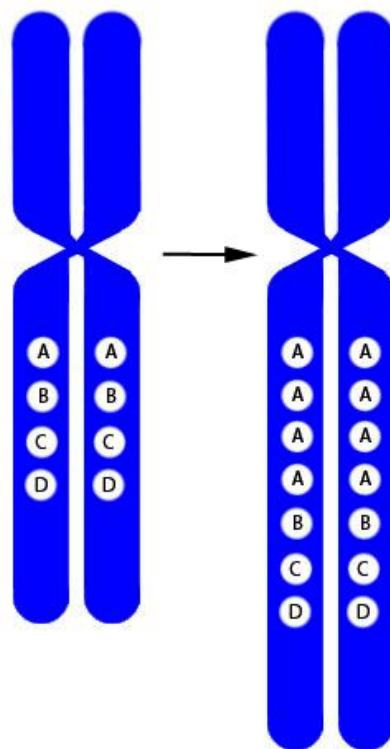


Рис. 48. Схема амплификации

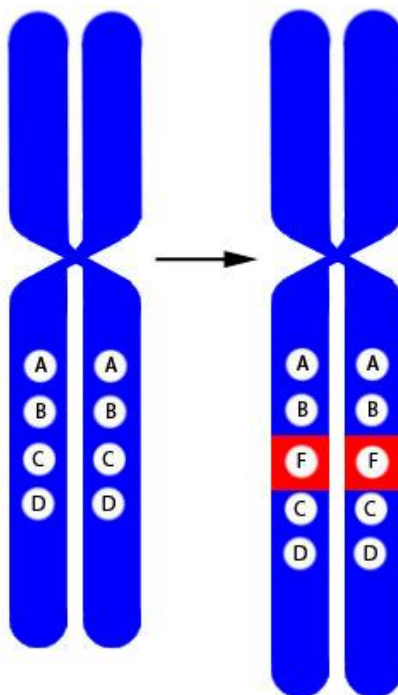


Рис. 49. Схема инсерции

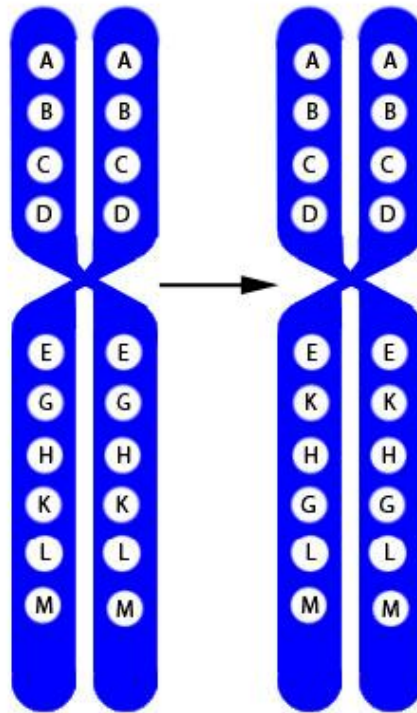


Рис. 50. Схема парацентрической инверсии

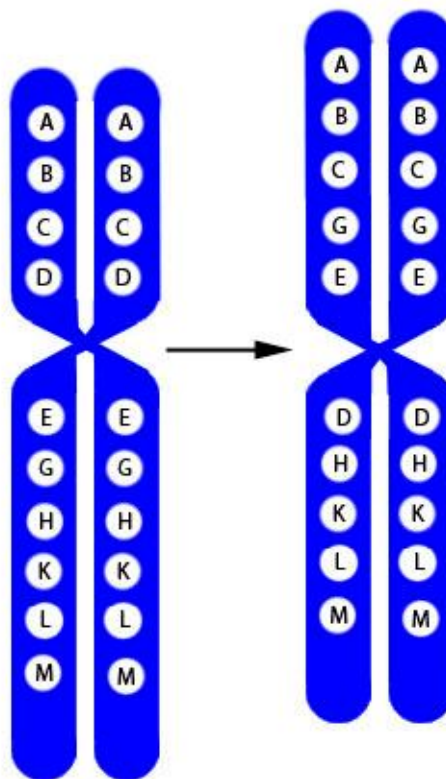


Рис. 51. Схема перичентрической инверсии

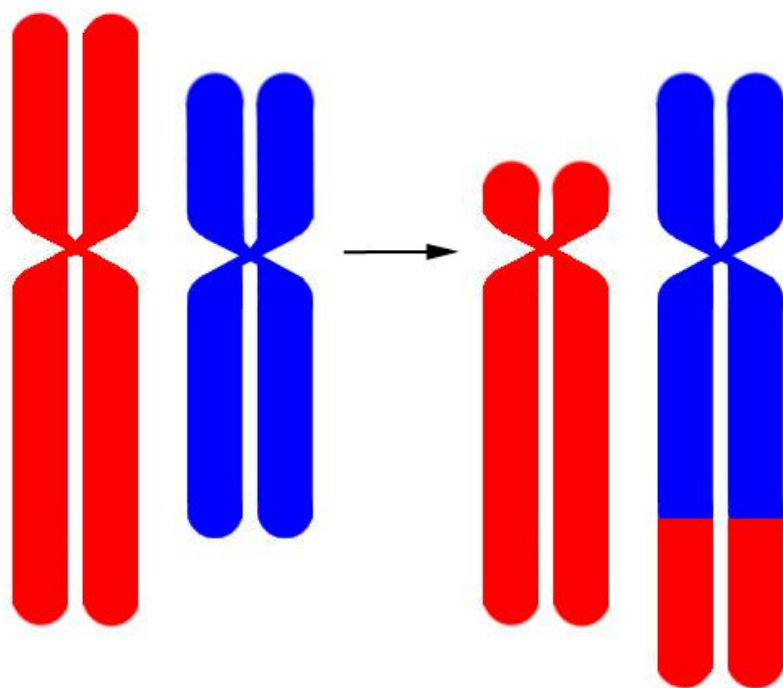


Рис. 52. Схема транслокации

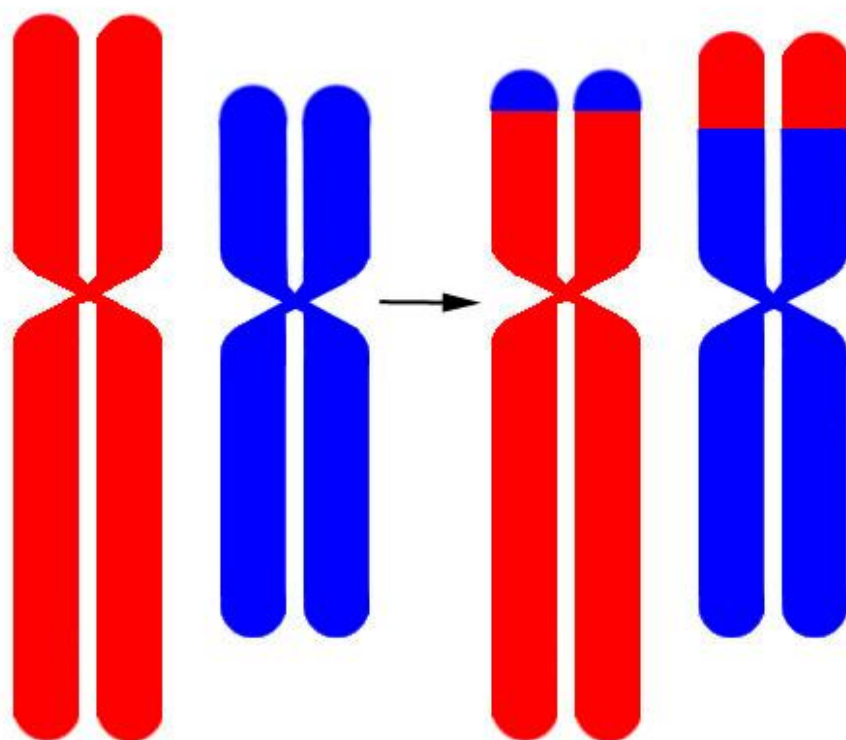


Рис. 53. Схема реципрокной транслокации

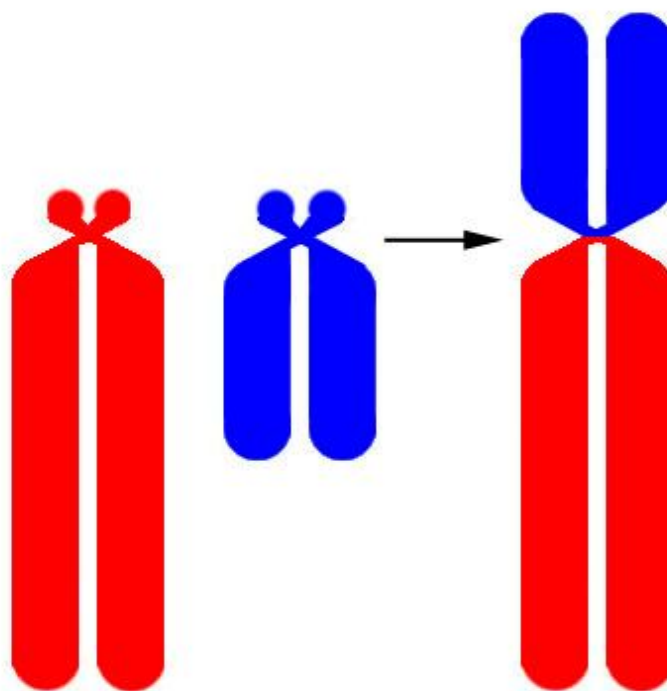


Рис. 54. Схема робертсоновской транслокации

Примеры:

46, XY, del (10) (q11 → q21) – мужской кариотип с делецией района 10q11-21;

46, XX, del 5p- – женский кариотип с делецией короткого плеча хромосомы 5;

inv 9 (p11; q13) – перичентрическая инверсия в хромосоме 9;

inv 5 (q21; q31) – парацентрическая инверсия в хромосоме 5;

5q33: – дефишенси длинного плеча хромосомы 5, разрыв расположен в районе 5q33;

t (2; 5) (q21; q31) – реципрокная транслокация хромосом 2 и 5.

Разрывы и воссоединения произошли в районах 2q21 и 5q31. Эту же транслокацию можно записать более подробно:

t (2; 5) (2pter → 2q21 :: 5q31 → 5qter; 5pter → 5q31 :: 2q21 → 2qter).

Иногда при цитогенетическом обследовании выявляются изохромосомы, состоящие из одинаковых плеч – только коротких или только длинных (рис. 55). Такая аберрантная хромосома обозначается «i».

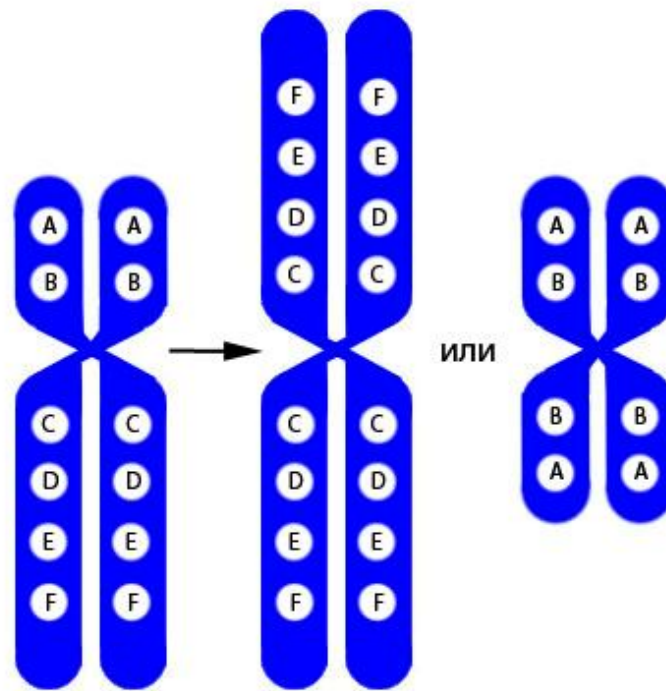


Рис. 55. Схема изохромосомы

Делеции концевых районов обоих плеч иногда приводят к формированию кольцевой хромосомы (обозначается «r») (рис. 56).

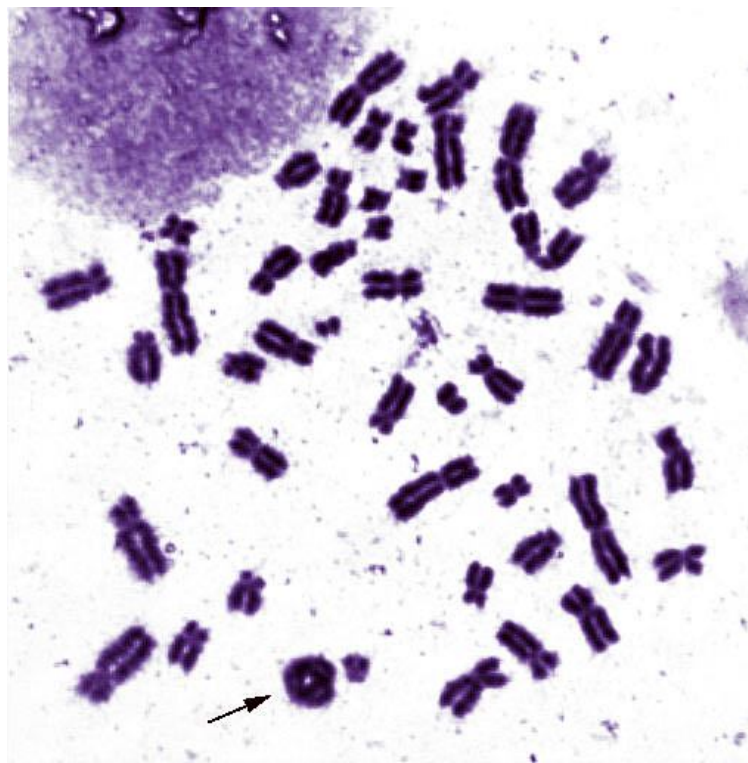


Рис. 56. Кольцевая хромосома (фото Е.Г. Нероновой)

Хромосомы с двумя центромерами (дицентрические хромосомы) (рис. 57) и хромосомные фрагменты без центромеры (ацентрические фрагменты) (рис. 58) возникают при нарушении спаривания гомологичных хромосом в мейозе у гетерозигот по парацентрическим инверсиям. Обычно в ходе нескольких митотических делений ацентрические фрагменты теряются, а дицентрики формируют характерные «мосты» в анафазе и разрываются, образуя в интерфазе микроядра – хроматиновые тельца в цитоплазме. Подобного рода перестройки могут происходить и в соматических клетках под воздействием сильных мутагенов (например радиации).



Рис. 57. Дицентрическая хромосома (фото Е.Г. Нероновой)

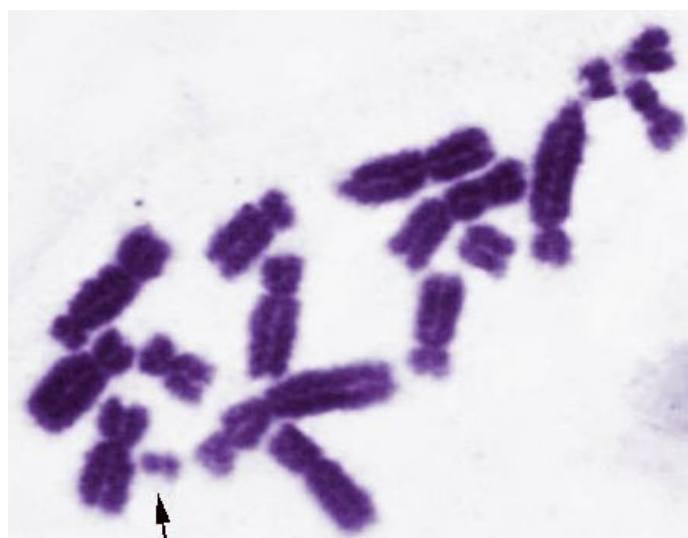


Рис. 58. Ацентрический фрагмент

Примеры:

46, XX, r (D) – женский кариотип, содержащий одну кольцевую хромосому из группы D.

46, X, i (Xp) – женский кариотип, в котором одна X-хромосома нормальная, а другая – изохромосома, состоящая из короткого плеча.

Наиболее известным случаем хромосомных aberrаций человека является *синдром кошачьего крика* (или *синдром Лежена*) – HSA5 del (5p-). Обычно делетировано от трети до половины короткого плеча хромосомы 5, реже встречается полная делеция 5p (рис. 59). Синдром встречается с частотой 1 на 45000. Наследуется по аутосомно-доминантному типу. Отмечается низкая масса при рождении, мышечная гипотония, гипертелоризм глаз, изменение гортани, приводящее к характерному типу плача ребенка, напоминающему мяуканье кошки. Последний признак проходит к концу первого года жизни. У больных встречаются микроцефалия, врожденные пороки сердца, костно-мышечной системы и внутренних органов, деформация ушных раковин, эпикантус, антимонголоидный разрез глаз (рис. 60).

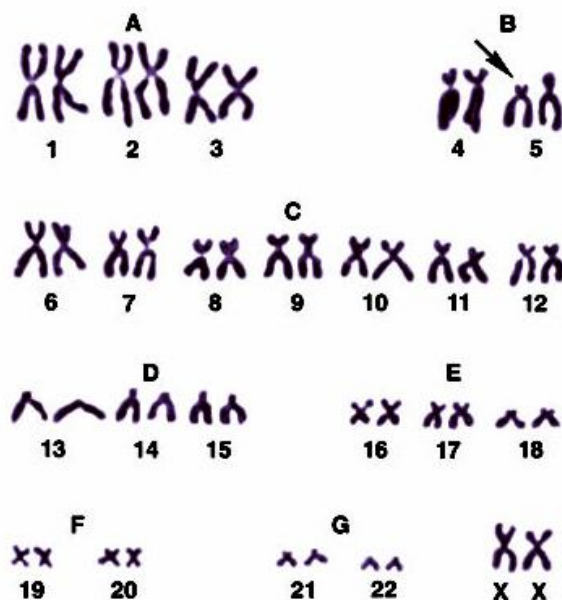


Рис. 59. Хромосомный набор больного с синдромом кошачьего крика: групповая (от A до G) и индивидуальная идентификация хромосом (стрелкой указан дефект короткого плеча хромосомы 5-й пары)*

* URL: <http://medarticle23.moslek.ru/articles/45310.htm>



Рис. 60. Ребенок с синдромом кошачьего крика*

Синдром Вольфа-Хиршхорна (синдром 4p) возникает по причине дефишенсии (терминальной делеции) короткого плеча хромосомы 4. Синдром встречается с частотой 1 на 96000 живых новорожденных. У большинства больных делетирован район 4p16.3, величина делеции – около 165 т.п.н. При меньшем размере делетированного участка проявляется менее выраженный фенотип. Использование рутинной окраски хромосом позволяет выявить эту аберрацию только в 60 % случаев. Флуоресцентная гибридизация *in situ* дает возможность выявлять до 95 % носителей. Для больных характерны микроцефалия, задержка внутриутробного развития, «рыбий» рот, краниофациальный дисморфизм, расщелина губы и нёба, низкорасположенные деформированные ушные раковины, гипертелоризм (рис. 61). Из внутренних органов чаще всего поражаются почки (диплазия, кисты), сердце (атриальный или вентрикулярный септальные дефекты) и семенники (крипторхизм). Выживает не более 20 % новорожденных с этим синдромом, продолжительность жизни – до 25 лет. У больных наблюдается глубокая задержка умственного развития.

* URL: <http://medarticle23.moslek.ru/articles/34943.htm>



Рис. 61. Ребенок с синдромом Вольфа-Хиршхорна*

В некоторых популяциях человека широко распространены перичентрические инверсии *inv 9* (p11; q13) (рис. 62) и *inv 10* (p11; q21) (рис. 63), не имеющие фенотипического проявления. Однако некоторые авторы указывают на возможность снижения фертильности у их носителей, поскольку инверсии затрудняют конъюгацию гомологичных хромосом у гетерозигот и подавляют кроссинговер на своих участках.

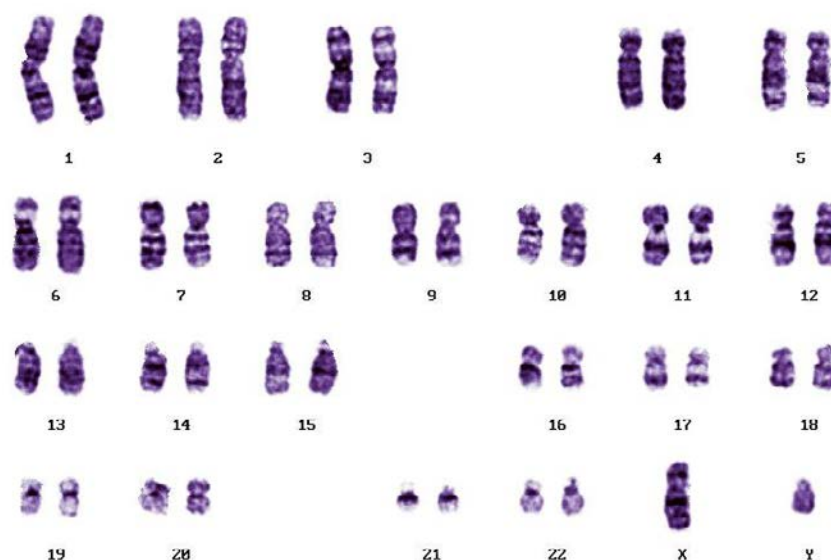


Рис. 62. Перичентрическая инверсия HSA9 (фото Е.Г. Нероновой)

* URL: http://en.wikipedia.org/wiki/Wolf-Hirschhorn_syndrome

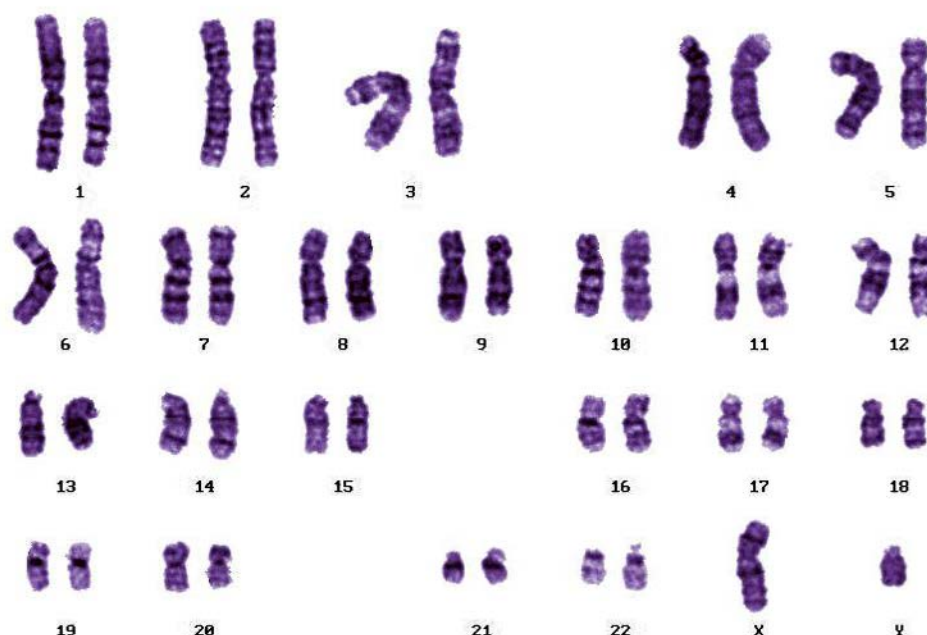


Рис. 63. Перичесентрическая инверсия HSA10 (фото Е.Г. Нероновой)

В популяциях человека часто встречается полиморфизм (биологическое разнообразие) длины гетерохроматиновых районов, в том числе вторичных перетяжек. Такие изменения принято обозначать h^+ – увеличение гетерохроматинового района (в том числе вторичных перетяжек) по сравнению с нормой и h^- – уменьшение. Как правило, фенотипического эффекта такие полиморфные варианты не имеют.

Примеры:

46, 15 ph^+ – увеличение длины вторичной перетяжки в коротком плече хромосомы 15;

46, 21 ph^- – уменьшение длины вторичной перетяжки в коротком плече хромосомы 21;

46, XY, Yqh^+ – увеличение гетерохроматинового района Y-хромосомы.

Причиной *хронического миелобластного лейкоза (ХМЛ)* является соматическая мутация – слияние части гена тирозинкиназы ABL1 9-й хромосомы с геном BCR 22-й хромосомы с образованием химерного белка (рис. 64). Филадельфийская хромосома, выявляемая у всех страдающих ХМЛ, – результат реципрокной транслокации $t(9; 22), (q34; q11)$. Название «фи-

ладельфийская» этой aberrантной хромосоме дано потому, что впервые ее обнаружили сотрудники Пенсильванского университета в Филадельфии. ХМЛ – миелопролиферативное заболевание, при котором в норме находящиеся в фазе G_0 гранулоциты (нейтрофилы, базофилы и эозинофилы) начинают активно делиться под влиянием химерного белка BCR/ABL1. В хронической фазе заболевания больные обычно чувствуют недомогание и переполнение живота. Акселеративная фаза заболевания может привести к бластному кризу, который протекает подобно острому лейкозу с быстрой прогрессией и небольшой выживаемостью.

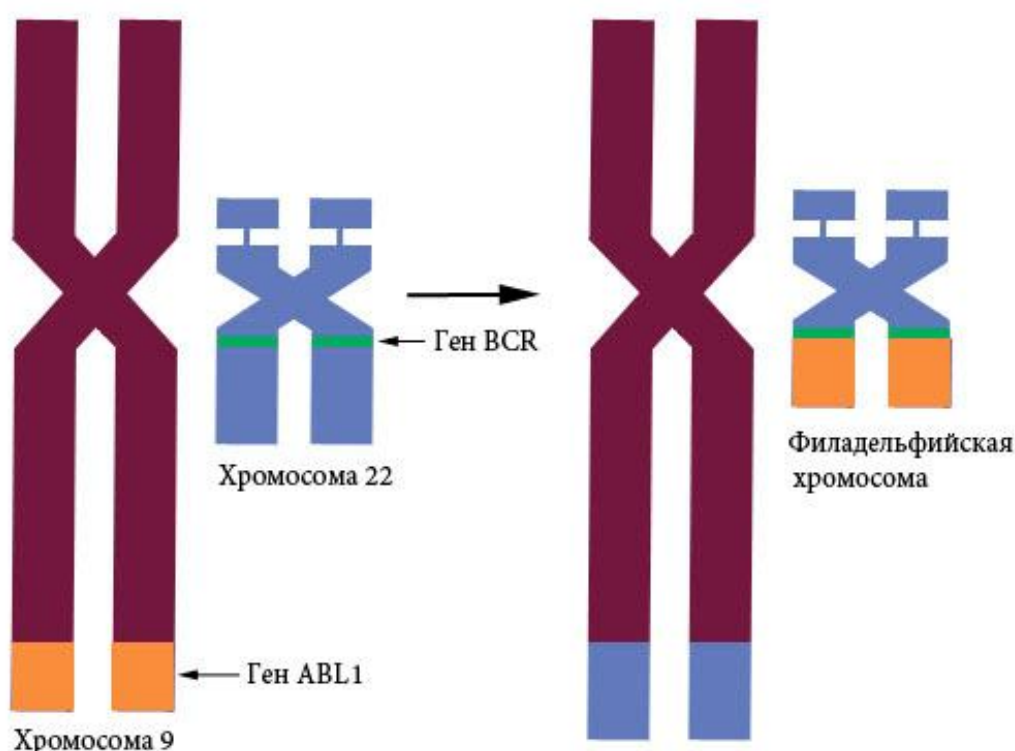


Рис. 64. Филадельфийская хромосома

Синдром Дауна иногда имеет транслокационную природу. Значительная часть хромосомы 21 может быть перемещена на другие хромосомы (чаще на 15, реже на 14, ещё реже на 21, 22 и Y-хромосому). В таких случаях при нормальном числе хромосом функционально будет присутствовать анеуплоидия по хромосоме 21.

На хромосоме X с частотой 1 на 1000 – 1 на 2000 новорожденных мальчиков в районе q27-28 наблюдается вторичная перетяжка – так называемый фрагильный сайт. Это *синдром Мартина-Белл* или *синдром ломкой X-хромосомы*. Молекулярный механизм заключается в экспансии тринуклеотидных ЦГГ (цитозин-гуанин-гуанин) повторов. В норме в районе Xq27.3 должно быть от 6 до 54 таких повторов, предмутационное состояние – от 55 до 200 таких повторов, в этом случае у матерей с предмутационным состоянием возможно увеличение числа повторов в мейозе из-за неравного кроссинговера, и их потомки могут получить мутантную (с числом повторов более 200) X-хромосому. Наиболее выражено появление синдрома в гемизиготе, т. е. у мальчиков с мутантной по фрагильному сайту X-хромосомой. Такие мальчики рождаются с весом 3,5–4 кг и макроорхизмом. Часто наблюдаются увеличенные размеры головы, длинное лицо с увеличенным подбородком, низкое расположение ушных раковин, повышенная подвижность суставов (рис. 51). Главные симптоматические признаки – умственная отсталость и своеобразные нарушения речи – эхолалия (неосмысленное повторение чужих слов) и персеверация (бормочущая речь). Иногда отмечается ранний детский аутизм.



Рис. 65. Синдром Мартина-Белл*

* URL: <http://blog.ahfr.org/2008/05/fragile-x-syndrome.html>

Следует отметить, что для всех хромосомных aberrаций характерны общие фенотипические проявления: низкий вес при рождении, задержка развития, низкий рост, микроцефалия, микрогнатия, нарушения остеогенеза, аномальное расположение глаз.

Контрольные вопросы и задания

1. Прочитайте кариологический диагноз:

а) 46, XX, t (1; 22), (q24; q12);

б) 46, XX, inv 7 (p11; p13);

в) 47, XY, +22, r (5);

г) 48, XXYY;

д) 46, XX, inv 4 (q11; q21);

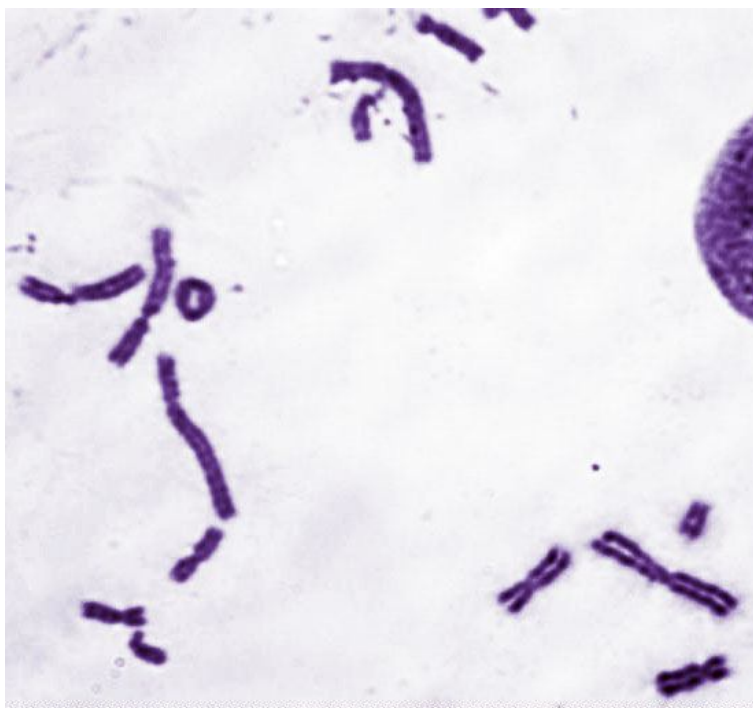
е) 45, X, inv X (p11; q13);

ж) 46, XY, i (4q);

з) 48, XX, +21, +16p+;

и) 45, X, 22ph+.

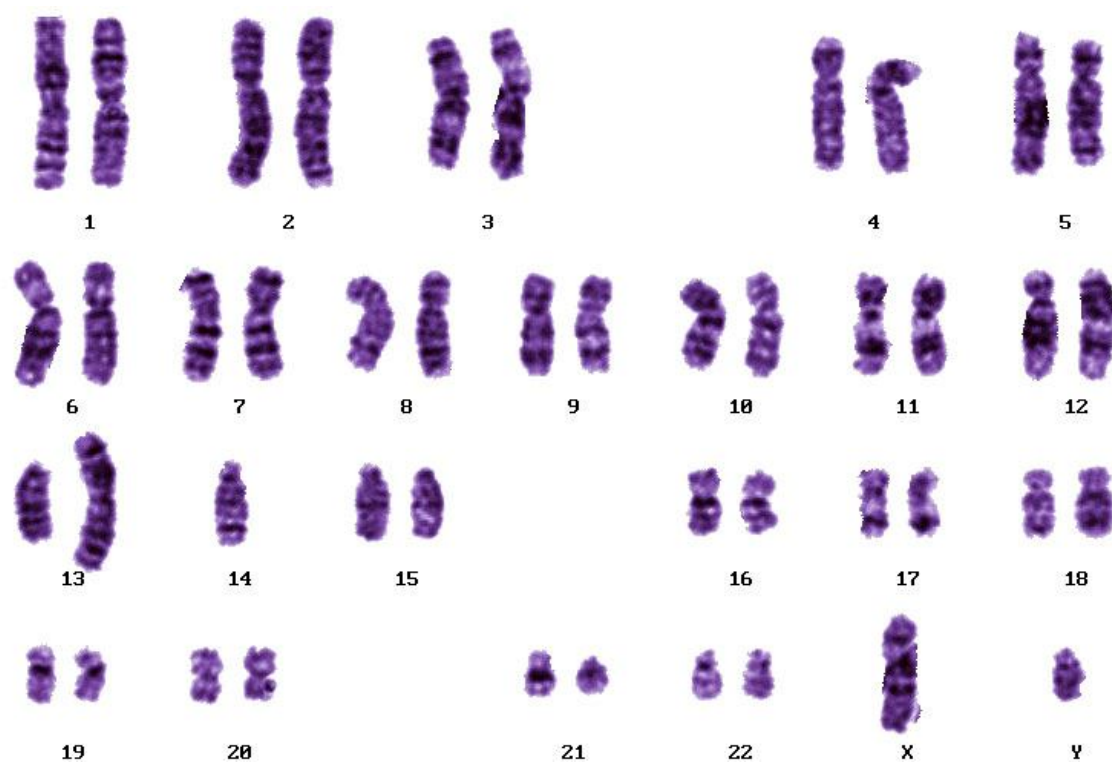
2. Поставьте кариологический диагноз на основе фотографий митотических хромосом на рис. 66.



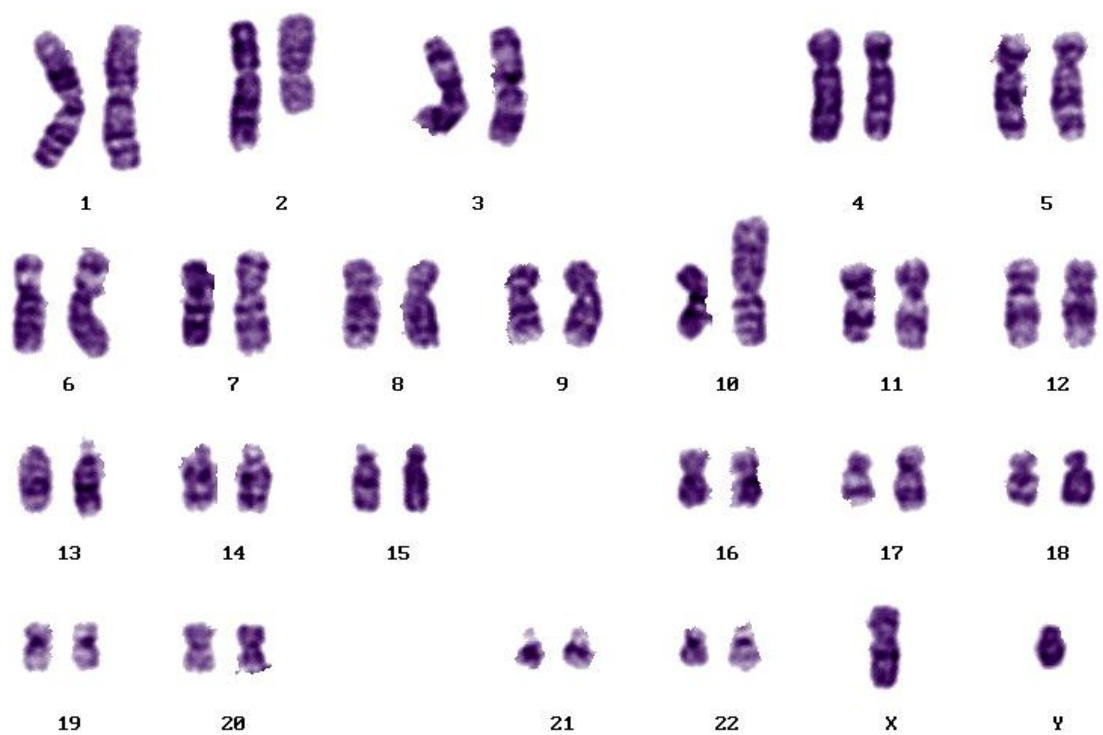
A.



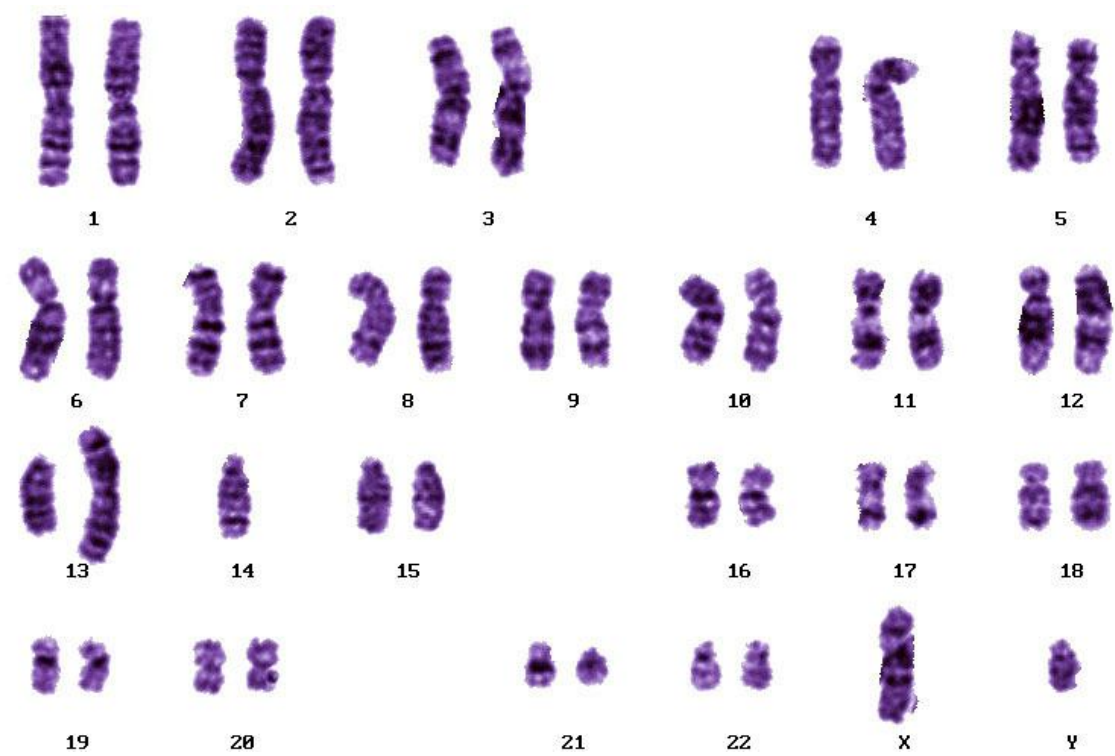
Б.



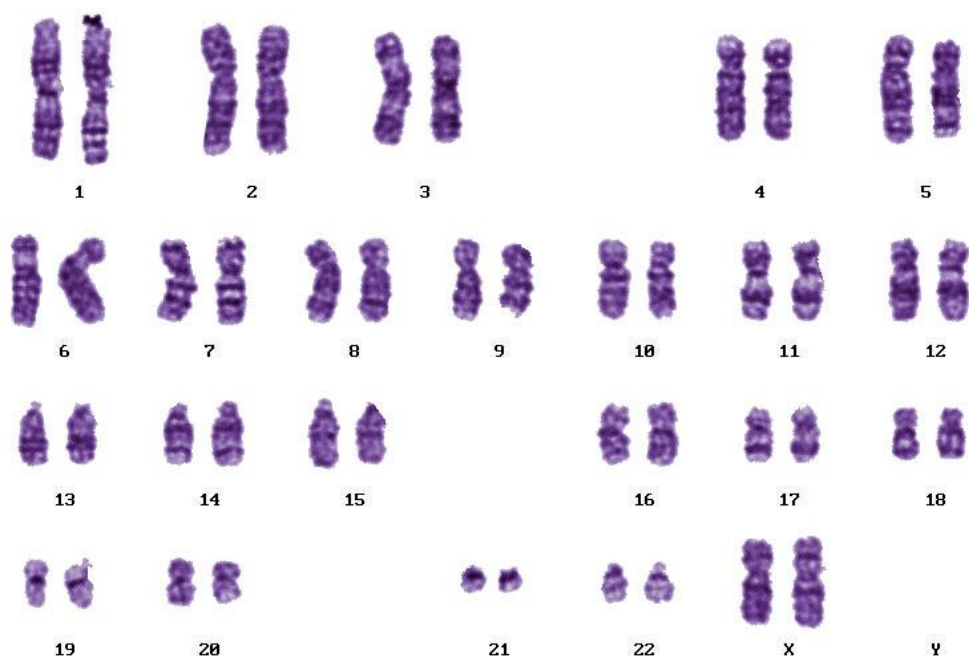
Б.



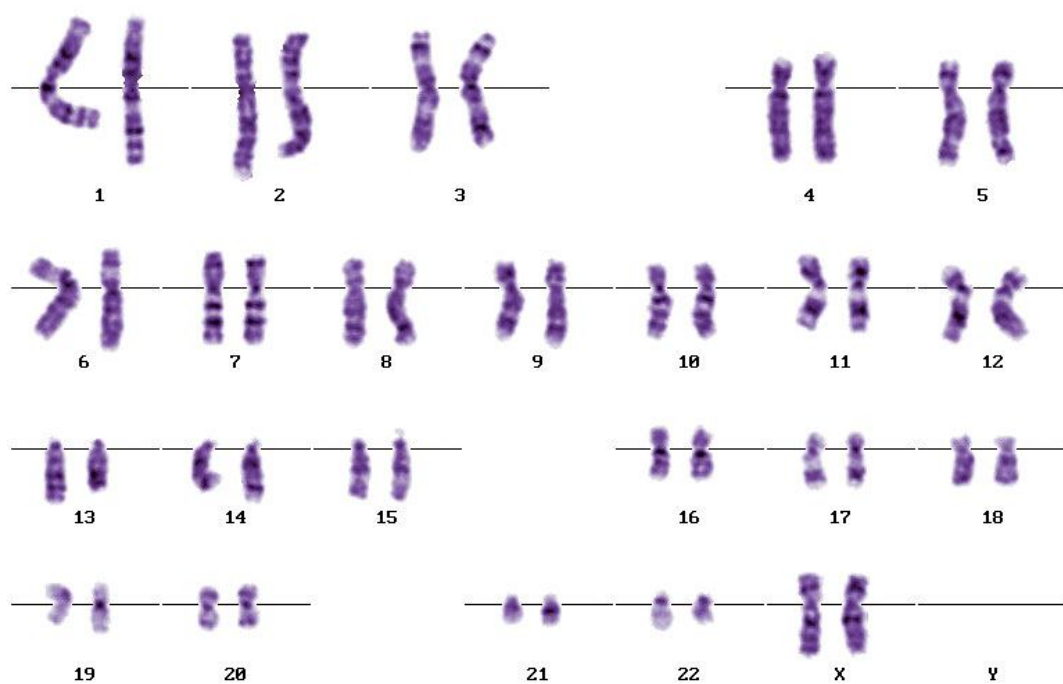
Г.



Д.



Е.



Ж.

Рис. 66. Фотографии фрагментов метафазных пластинок
(для задачи 2 к гл. V) (фото Е.Г. Нероновой)

Глава 6. Нуклеиновые кислоты

6.1. Структура ДНК и РНК

Нуклеиновые кислоты – полимерные (состоящие из повторяющихся единиц) химические вещества, содержащие информацию о структуре белковых молекул (кодирующие последовательности ДНК и матричная РНК), управлении их синтезом (регуляторные последовательности ДНК и сигнальные последовательности РНК) или выполняющие самостоятельные функции, так или иначе связанные с передачей наследственной информации (рибосомная РНК, транспортная РНК, малая ядерная РНК, малая интерферирующая РНК).

ДНК и РНК состоят из нуклеотидов – фосфорных эфиров нуклеозидов (связанных с сахаром – дезоксирибозой или рибозой азотистых оснований) аденозина (А), гуанидина (Г), тимидина (Т), уридина (У) и цитидина (Ц). Азотистые основания – гетероциклические органические соединения, производные пурина – аденин и гуанин, или пиримидина – тимин, урацил, цитозин. Комплементарность (образование связей между взаимодополняющими фрагментами молекул) пар АТ (АУ) и ГЦ обеспечивается наличием двух или трех водородных связей соответственно. В одной цепи нуклеотиды связаны путем образования 5' – 3' сахарофосфатной ковалентной связи (рис. 67). При этом комплементарные цепи ориентированы в противоположных направлениях одна 5'→3', а другая – 3'→5' (они антипараллельны).

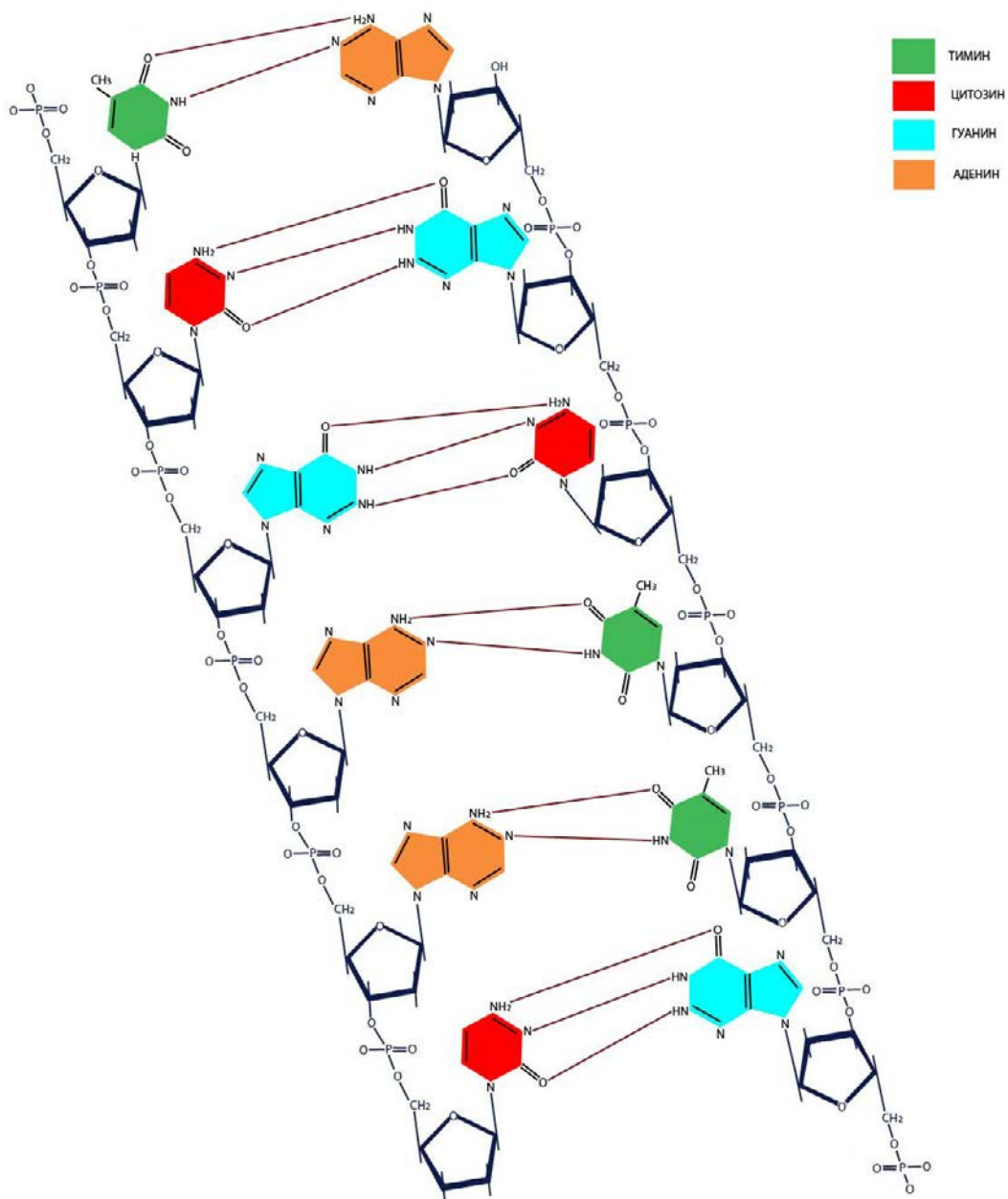


Рис. 67. Первичная структура ДНК

У всех живых существ, кроме некоторых вирусов, молекула ДНК имеет спиральную вторичную структуру, в которой азотистые основания находятся внутри, а сахарофосфатный остов – снаружи (рис. 68).

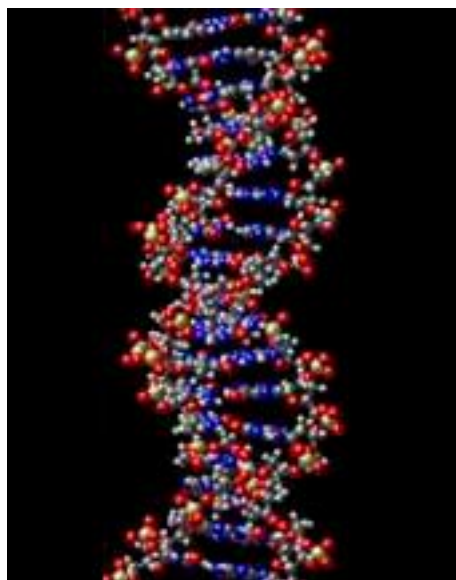


Рис. 68. Вторичная структура ДНК

Из принципа комплементарности (возможности образования пар аденина с тиминем (урацилом) и гуанина с цитозином) следует правило Чаргаффа:

- количество аденина равно количеству тимина, а количество гуанина – количеству цитозина: $A=T$, $G=C$;
- количество пуринов равно количеству пиримидинов: $A+G=T+C$;
- количество оснований с шестью аминогруппами равно количеству оснований с шестью кетогруппами: $A+C=G+T$.

Соотношения АТ- и ГЦ- могут быть различны в разных районах хромосом. Например, у млекопитающих G⁺-районах преобладают АТ-пары, а в R⁺-районах – ГЦ (разд. 5.4).

Интересно, что основная «молекула жизни» – ДНК – сама по себе мертва и оживает только в процессах репликации и транскрипции при помощи особых ферментов – полимераз, которые обеспечивают ее копирование и прочтение.

Существует несколько типов РНК, имеющих различную вторичную и третичную структуры. Наибольшее биологическое значение имеют матричная (информационная) РНК (мРНК), транспортная РНК (тРНК), рибосомная РНК (рРНК), малая ядерная РНК (мяРНК) и малая интерферирующая РНК.

Матричная РНК (мРНК) комплементарна кодирующим последовательностям ДНК и содержит информацию об аминокислотной последовательности своего белкового продукта. Считывание мРНК происходит в процессе трансляции – синтеза белка на основе мРНК. Каждой из 20 канонических (универсальных для живых организмов) аминокислот соответствует набор из трех триплет-нуклеотидов – кодон. Одной аминокислоте может соответствовать два или несколько кодонов – в этом заключается вырожденность генетического кода. Три кодона не кодируют аминокислот, поэтому синтез белка на них останавливается. Это стоп-кодона или нонсенс-кодона: УАГ (амбер), УГА (опал) и УАА (охра). Кроме содержащей кодоны (транслируемой) области, зрелая мРНК содержит нетранслируемые области, которые регулируют стабильность молекулы и интенсивность считывания. Молекулы мРНК иногда имеют двуцепочечные участки – шпильки и псевдоузлы, – которые могут участвовать в регуляции трансляции.

Транспортная РНК (тРНК) имеет вторичную структуру, напоминающую лист клевера (рис. 69). На центральной петле находится антикодон – триплет, комплементарный кодону соответствующей данной молекуле тРНК аминокислоты. К противоположному концу молекулы тРНК прикрепляется аминокислота.

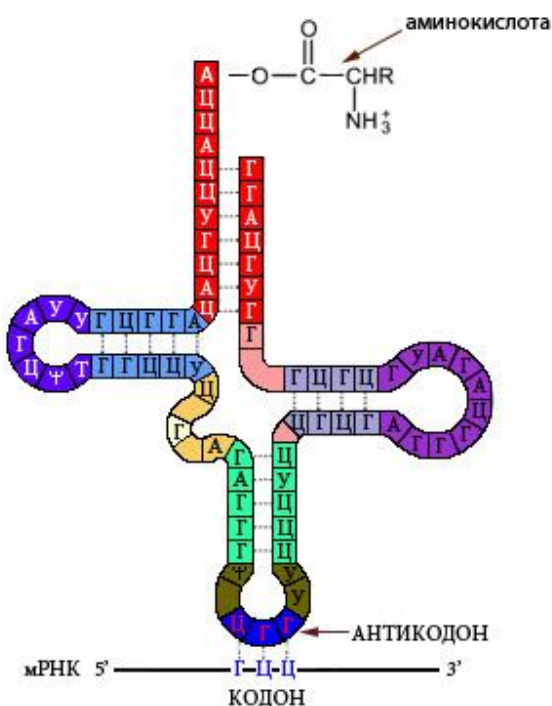


Рис. 69. Транспортная РНК

Рибосомная РНК (рРНК) входит в состав рибосом (рис. 70) и выполняет каталитическую функцию при образовании пептидных связей между аминокислотными остатками в процессе трансляции. Малая частица рибосомы эукариот представляет собой рибонуклеопротеиновый комплекс на основе субъединицы РНК с константой седиментации (скорости осаждения при центрифугировании) 40S (S – единица Сведборга), которая состоит из молекул 18S РНК. Основой большой частицы рибосомы является субъединица 60S, которая состоит из трех молекул рРНК – 28S, 5,8S и 5S. Рибосомная РНК составляет около 70 % от общего количества РНК в клетке. Митохондрии имеют свои особые рибосомы, состоящие из 50S и 30S субъединиц (подобно бактериальным рибосомам).

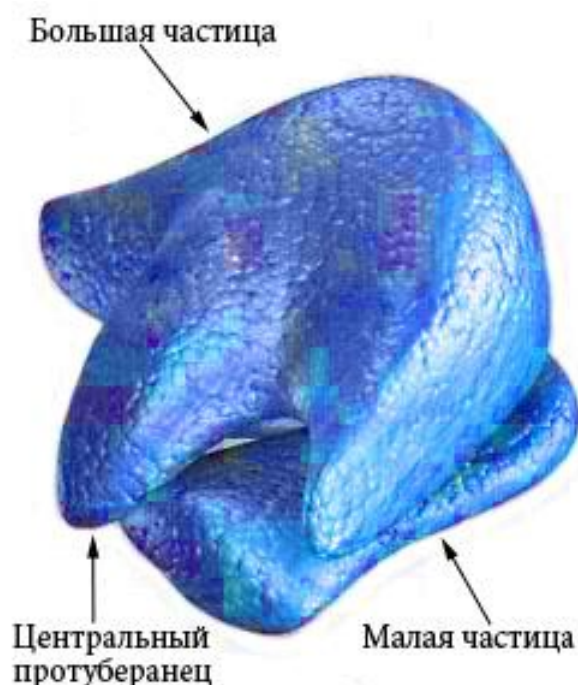


Рис. 70. Схема строения рибосомы*

Малая ядерная РНК (мяРНК) представлена молекулами с большим содержанием уридина длиной 100-300 нуклеотидов, которые входят в состав мелких рибонуклеопротеиновых гранул ядра. Функция этого типа РНК заключается в участии в созревании молекул мРНК.

* URL: <http://www.cartage.org.lb/en/themes/sciences/zoology/animalphysiology/anatomy/animalcellstructure/Ribosomes/Ribosomes.htm>

Малая интерферирующая РНК представлена короткими (20–25 нуклеотидов) двуцепочечными молекулами, которые, связываясь с отдельными мРНК по принципу комплементарности, могут подавлять синтез определенных белков и приводить соответствующую молекулу мРНК к деградации. В этом заключается явление РНК-интерференции. Особое значение этот тип РНК имеет в онтогенезе – индивидуальном развитии организмов.

6.2. Репликация ДНК

Репликация ДНК – это процесс удвоения молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты с образованием идентичных дочерних молекул. У человека репликация происходит в фазе S клеточного цикла. Репликацию ДНК осуществляет фермент ДНК-полимераза.

Для протекания процесса репликации необходимо расплести двойную спираль ДНК, вращать макромолекулу и удерживать ее в расплетенном состоянии. Эти функции выполняют гираза (расплетение спирали), хеликаза (разделение нитей), и ДНК-связывающие белки (удержание). Точность репликации обеспечивается принципом комплементарности пар оснований и свойствами ДНК-полимеразы, благодаря которым этот фермент способен распознать и исправить ошибку. У эукариотических организмов в процессе репликации принимают участие несколько типов ДНК-полимераз. После удвоения происходит суперспирализация синтезированных молекул и дальнейшая компактизация ДНК. Процесс репликации требует затрат энергии.

Ранее существовали три модели механизма репликации ДНК. Согласно консервативному механизму в результате репликации одна молекула ДНК состоит только из родительских цепей, а другая – только из дочерних цепей. Дисперсионная модель предполагала, что все получившиеся в результате репликации молекулы ДНК состоят из цепей, одни участки которых вновь синтезированы, а другие взяты из родительской молекулы ДНК. Полуконсервативный механизм репликации заключается в том, что каждая молекула ДНК состоит из одной цепи исходной родительской молекулы и одной вновь синтезированной цепи. Полуконсервативный механизм был доказан в 1958 г. опытами М. Мезельсона и Ф. Сталя.

Поскольку ДНК-полимераза не умеет начинать синтез новой нити на одонитевой матрице, а может только прикреплять новые нуклеотиды к уже имеющейся цепи, инициация репликации происходит путем образования небольшого участка ДНК-РНК при помощи фермента ДНК-праймазы. К 3'-концу РНК-затравки ДНК-полимераза добавляет новые нуклеотиды, а РНКаза Н потом разрушает РНК в гибридных участках. Лигаза сшивает синтезированные фрагменты ДНК (рис. 71).

ДНК-полимераза может вести синтез только в направлении $5' \rightarrow 3'$, т. е. присоединять новый нуклеотид к 3'-концу уже синтезированной части. Двунитевая структура ДНК предполагает необходимость синтеза в двух направлениях $5' \rightarrow 3'$ и $3' \rightarrow 5'$. Эта задача решается путем образования Y-образной структуры – репликационной вилки (рис. 71). При этом цепь $3' \rightarrow 5'$ является лидирующей – синтез на ней идет непрерывно, а цепь $5' \rightarrow 3'$ – отстающей, поскольку на ней синтез идет в отдельных участках – фрагментах Оказаки, каждый из которых начинается с новой РНК-затравки.

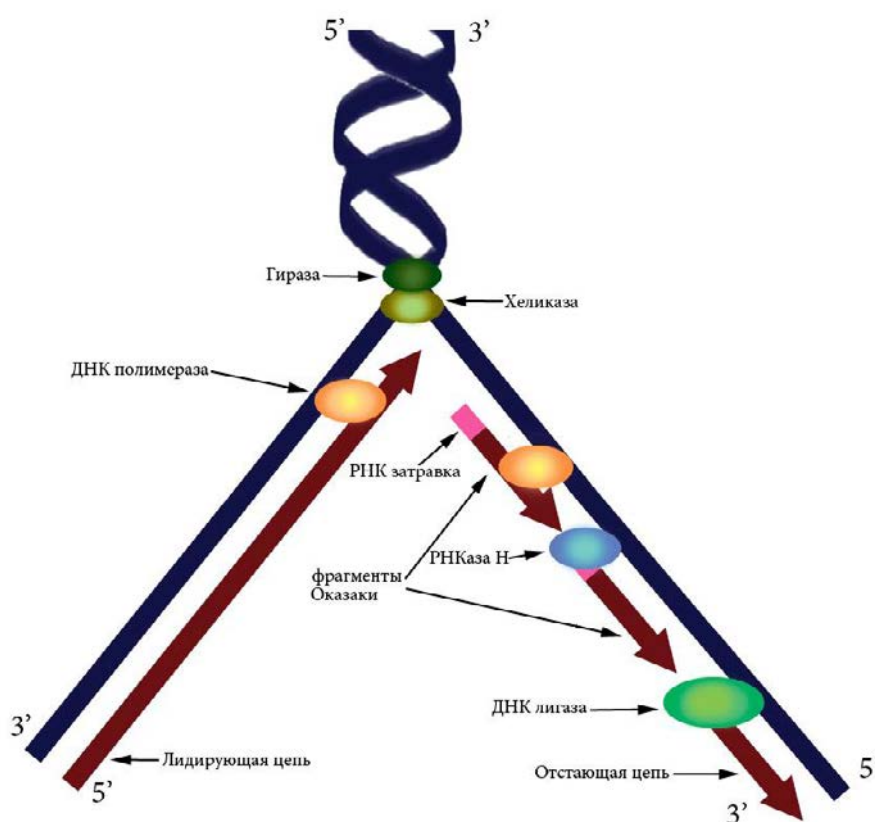


Рис. 71. Схема репликационной вилки

6.3. Транскрипция

Транскрипцией называется синтез мРНК на матрице ДНК. Процесс синтеза РНК протекает в направлении от 5'- к 3'- концу, т. е. по матричной цепи ДНК ДНК-зависимая РНК-полимераза – фермент, осуществляющий транскрипцию, – движется в направлении 3'→5', прикрепляя новый рибонуклеозидтрифостат к 3'-концу уже синтезированной молекулы РНК.

Инициация транскрипции – сложный процесс, зависящий от последовательности ДНК, находящейся вблизи транскрибируемой последовательности – промотора и от более удаленных от точки начала синтеза участков генома – энхансеров (активирующих транскрипцию) и сайленсеров (дезактивирующих транскрипцию). Во всех этих участках есть сайты связывания транскрипционных факторов – белков, регулирующих процесс транскрипции и входящих в состав транскрипционного комплекса.

При переходе транскрипции от инициации к следующей стадии – элонгации – происходит диссоциация связей между РНК-полимеразой, промотором и факторами инициации транскрипции.

В период элонгации в ДНК расплетено примерно 18 пар нуклеотидов. Примерно 12 нуклеотидов матричной нити ДНК образует гибридную спираль с растущей цепью РНК. По мере движения РНК-полимеразы по матрице впереди нее происходит расплетание двухцепочечной молекулы ДНК, а позади фермента двойная спираль ДНК восстанавливается. В этот момент из комплекса освобождается очередное звено растущей цепи РНК с матрицей и РНК-полимеразой. Все эти перемещения подразумевают относительное вращение РНК-полимеразы и ДНК. Поэтому для предотвращения такого вращениядвигающуюся по ДНК РНК-полимеразу сопровождают топоизомеразы. На стадии элонгации в процессе транскрипции немаловажную роль играют также основные элонгирующие факторы, которые необходимы для предотвращения преждевременной терминации матричного процесса.

Следующая фаза процесса транскрипции называется терминацией. В этот момент растущий транскрипт освобождается и происходит диссоциация РНК-полимеразы и ДНК-матрицы. После завершения стадии терминации транскрипции происходит разрезание РНК, а затем к её 3'-концу с помощью фермента полиА-полимеразы добавляется 100–200 оснований аденина, которые оказывают влияние на стабильность полученного транскрипта.

6.4. Процессинг РНК

Созревание мРНК называется процессингом. Биологическое значение процессинга в эукариотической клетке заключается в возможности получения различных комбинаций экзонов гена, а значит, получения большего разнообразия белков, кодируемых одной нуклеотидной последовательностью ДНК. Кроме того модификация 3'- и 5'-концов мРНК служит для регуляции ее экспорта из ядра, поддержания стабильности в цитоплазме и для улучшения взаимодействия с рибосомами.

Еще до завершения транскрипции происходит полиаденилирование 3'-конца (разд. 6.3). К 5'-концу мРНК посредством трифосфатного моста присоединяется 7-метилгуанозин, соединяющийся в необычной позиции 5'→5', и происходит метилирование рибоз двух первых нуклеотидов. Этот процесс называется кэпированием.

Процесс вырезания определенных нуклеотидных последовательностей из молекул РНК и соединения последовательностей, сохраняющихся в «зрелой» молекуле, в ходе процессинга РНК, называется сплайсингом. В ходе сплайсинга из мРНК участки, не кодирующие белок (интроны), удаляются, а экзоны – участки, кодирующие аминокислотную последовательность, соединяются друг с другом, и незрелая пре-мРНК превращается в зрелую мРНК, с которой синтезируются (транслируются) белки клетки.

Для сплайсинга необходимо наличие специальных 3'- и 5'- последовательностей. Сплайсинг катализируется состоящим из РНК и белков большим комплексом, который называется сплайсосомой. Сплайсосома включает пять малых ядерных рибонуклеопротеидов (мяРНП) – U1, U2, U4, U5 и U6. РНК, входящая в состав мяРНП, взаимодействует с интроном и, возможно, участвует в катализе. Она принимает участие в сплайсинге интронов, содержащих в 5' сайте ГУ, и АГ в 3' сплайсинг-сайте.

Иногда мРНК в процессе созревания могут подвергаться альтернативному сплайсингу, который заключается в том, что имеющиеся в составе пре-мРНК интроны вырезаются в разных альтернативных комбинациях, при которых вырезаются и некоторые экзоны. Некоторые из продуктов альтернативного сплайсинга пре-мРНК нефункциональны, как например, при определении пола у плодовой мушки дрозофилы, однако часто в результате альтернативного сплайсинга пре-мРНК одного гена образуются многочисленные мРНК и их белковые продукты.

В настоящее время известно, что у человека 94 % генов подвержено альтернативному сплайсингу (остальные 6 % генов не содержат интронов). Альтернативный сплайсинг у многоклеточных эукариот является ключевым механизмом увеличения разнообразия белков, не создавая избыточных копий гена, а также позволяет осуществлять тканеспецифическую и стадийспецифическую регуляцию экспрессии (проявления) генов.

6.5. Трансляция

Синтез белковых молекул из аминокислот на матрице мРНК при участии рибосом и тРНК называется трансляцией. Процесс происходит в цитоплазме на полисомах – комплексах, состоящих из мРНК и многих рибосом с прикрепленными молекулами тРНК (рис. 72).

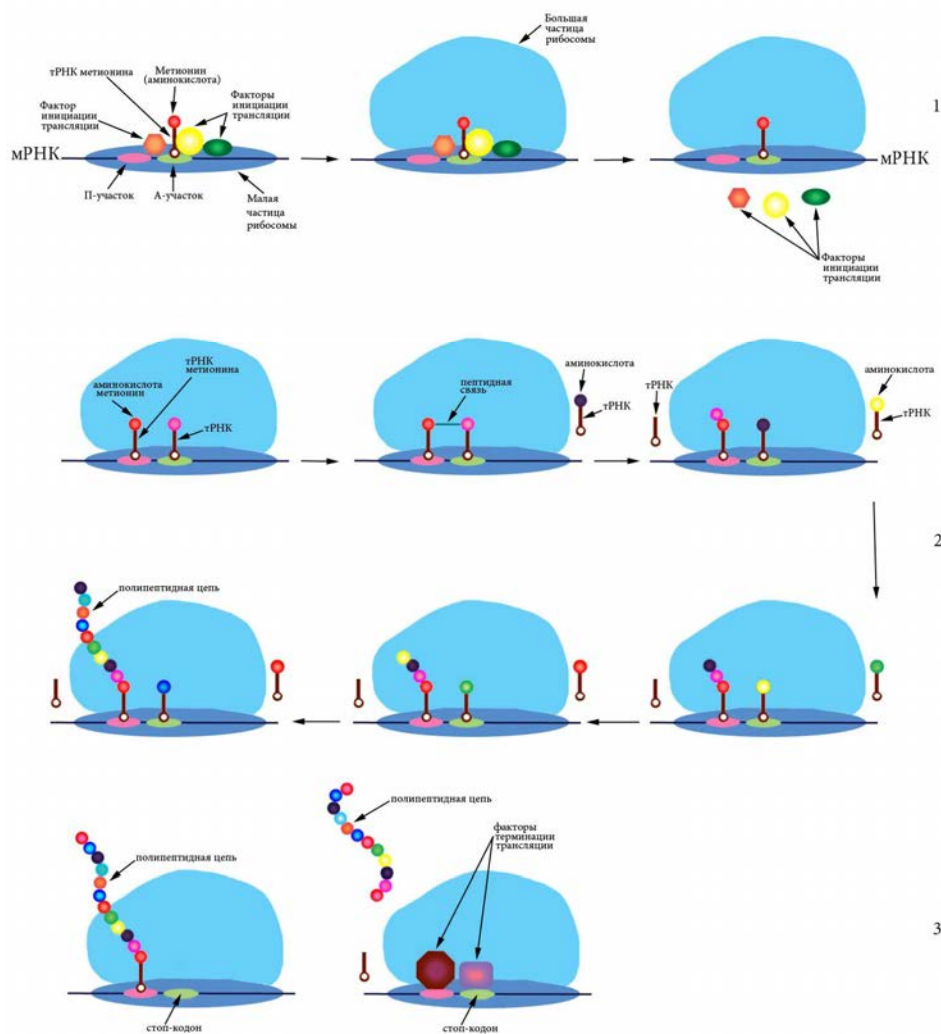


Рис. 72. Схема трансляции:

1 – инициация, 2 – элонгация, 3 – терминация

Процесс состоит из инициации (узнавания рибосомой стартового кодона и начала синтеза), элонгации (синтеза белка) и терминации (узнавания стоп-кодона и отделения белкового продукта).

Поскольку каждый кодон состоит из трех нуклеотидов, каждая последовательность может быть прочитана трояко – начиная с первого, второго либо третьего нуклеотида, иными словами, имеется три возможных рамки считывания. Стартовым кодоном почти всегда является АУГ. Рамки считывания, начинающиеся с этого кодона, называются открытыми. Для инициации рибосома сканирует мРНК, пока не найдет кодон АУГ. Обычно она воспринимает только те стартовые кодоны, которые находятся вблизи 5'-кэпа. Специальные белки – фак-

торы инициации трансляции – участвуют в узнавании стартового кодона и присоединении инициаторной тРНК, содержащей антикодон УАЦ, соответствующий аминокислоте метионин. К этой тРНК метионин присоединен при помощи фермента аминоацил-тРНК-синтетазы. Вначале малая частица рибосомы (сама или в комплексе с тРНК) садится на мРНК, а затем к ней присоединяется большая частица, и происходит отсоединение факторов инициации трансляции. Собранный рибосома начинает элонгировать цепь. В ходе элонгации один белковый фактор переносит тРНК в аминоацильный центр рибосомы (А-центр), а после формирования пептидной связи в пептидном центре (П-центре) второй фактор элонгации катализирует смещение рибосомы на один триплет (рис. 72). Когда рибосома доходит до одного из нонсенс-кодонов – УАГ (амбер), УГА (опал) или УАА (охра) – подходящей тРНК не обрывается, и новая пептидная связь не образуется. Под действием специальных белковых факторов происходит отделение рибосомы от мРНК и освобождение готовой белковой молекулы.

6.6. Рекомбинация

Генетическая рекомбинация – процесс, при котором происходит разрыв молекулы нуклеиновой кислоты (обычно ДНК, но возможно и РНК) и соединение с другой молекулой ДНК. Рекомбинация может происходить как между сходными молекулами ДНК – гомологичная рекомбинация, так и между различающимися – негомологичная рекомбинация. У эукариот рекомбинация происходит в процессе мейоза в ходе кроссинговера и иногда в соматических клетках. Процесс кроссинговера приводит к появлению потомков с комбинациями генов, отличными от родительских, и появлению новых химерных аллелей. У организмов, имеющих адаптивную иммунную систему, имеется особая система рекомбинации, благодаря которой быстро образуется большое разнообразие лимфоцитов, способных узнавать новые антигены. В генной инженерии под рекомбинантной ДНК понимают молекулы, полученные в результате искусственно осуществленной рекомбинации молекул ДНК,

часто принадлежащих разным видам. Лучшим примером такого подхода является получение рекомбинантных белков, нашедших свое применение в фармакологии и медицине. Этот метод очень важен для биомедицинских исследований, поскольку позволяет изучать эффекты определенных генов. В процессе рекомбинации задействовано множество различных ферментов, называемых рекомбиназами.

В мейозе в процессе кроссинговера происходит рекомбинация между спаренными гомологичными хромосомами, унаследованными от каждого из родителей. В ходе профазы I все четыре хроматиды расположены достаточно близко друг от друга, так что две хроматиды могут перекрещиваться одна с другой, и в этот момент может происходить обмен генетической информацией в гомологичных сайтах (разд. 5.2).

6.7. Репарация ДНК

Репарация – исправление повреждений в молекулах ДНК, возникших из-за ошибок ДНК-полимеразы в процессе репликации или вследствие воздействия физических или химических агентов. Процессы репарации осуществляются специальными ферментными системами клетки. Дефекты ферментов систем репарации приводят к развитию ряда наследственных заболеваний, таких как пигментная ксеродерма.

Имеется по крайней мере две ферментные системы репарации – прямая и эксцизионная. При прямой репарации задействованы специфические ферменты, быстро (обычно в одну стадию) устраняющие соответствующее повреждение, восстанавливая исходную структуру нуклеотидов. Это наиболее простой путь устранения повреждений ДНК. Так действует, например, Об-метилгуанин-ДНК-метилтрансфераза, которая переносит метильную группу с азотистого основания на один из собственных остатков цистеина.

Эксцизионная репарация заключается в удалении (эксцизии) повреждённых азотистых оснований из ДНК с последующим восстановлением нормальной структуры молекулы.

Системы репарации включают следующие компоненты:

- фермент, способный узнавать изменённые участки в цепи ДНК и делать надрез цепи вблизи повреждения;
- фермент, удаляющий повреждённый участок;
- фермент (ДНК-полимераза), синтезирующий соответствующий участок цепи ДНК взамен удалённого;
- фермент (ДНК-лигаза), восстанавливающий непрерывность полимерной цепи.

Существует также рекомбинационная репарация.

6.8. Генная конверсия

Генная конверсия – процесс, при котором информация последовательности ДНК передается (переносится) с одной нити ДНК, которая остается неизменной, на другую нить ДНК, последовательность которой изменяется. Это один из механизмов генных мутаций. Генная конверсия может быть причиной неменделевского наследования.

Такая конверсия одной аллели в другую происходит по причине репарации неправильно спаренных оснований в ходе рекомбинации. При конъюгации одной из четырех нитей с другой из гомологичной хромосомы репарация неправильно спаренных оснований может пройти по матрице другой хромосомы, что приводит к замене аллеля (рис. 73).

В норме диплоидный организм несет по одному аллелю от каждого из родителей (соотношение гамет в мейозе 1А:1а у гетерозиготы). При конверсии это соотношение изменяется (3А:1а, 1А:3а, 5А:3а или 3А:5а). Генные конверсии могут быть причиной наследственных заболеваний.

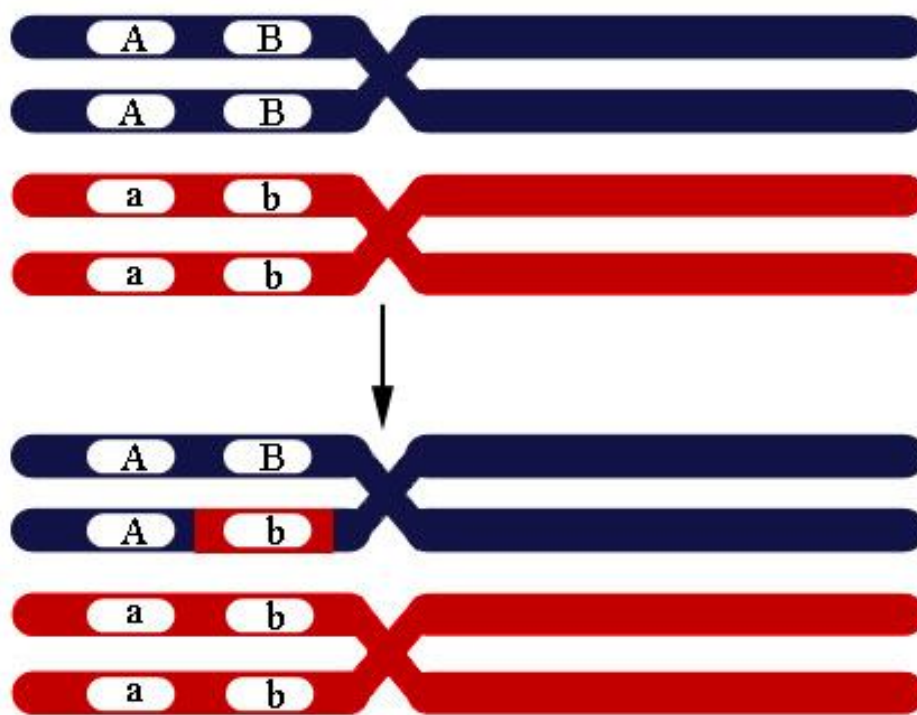


Рис. 73. Конверсия генов

6.9. Подвижные элементы генома

Мобильные генетические элементы (МГЭ) представляют собой участки ДНК, способные перемещаться по геному. К ним относятся:

- транспозоны;
- плазмиды;
- бактериофаги;
- интроны группы 2.

Для млекопитающих из всех МГЭ наиболее характерны транспозоны. Транспозон – это последовательность ДНК, которая способна перемещаться внутри генома в результате процесса, который называется транспозицией. Встраиваясь в геном, транспозоны могут вызывать различные мутации, в том числе и хромосомные перестройки. Транспозоны обычно состоят из двух прямых или инвертированных повторяющихся последовательностей ДНК, между которыми находятся гены, необходимые для транспозиции. Иногда в составе центральной части транспозонов находятся гены, которые обеспечивают

эволюционное преимущество для организма, содержащего мобильный элемент. Различают два класса транспозонов: к первому относят ретротранспозоны, перемещение которых по геному происходит путём обратной транскрипции, второй класс – ДНК-транспозоны, перемещающиеся путём прямого вырезания и вставки с использованием фермента транспозазы.

Транспозоны могут играть важную роль в геноме организма. Так например, некоторые гены-регуляторы, обеспечивающие адекватную реакцию растений на изменения освещенности, появились в результате встраивания в их геном транспозонов. Транспозоны могут быть причиной дестабилизации генома. Не менее 80 % мутаций являются следствием активности этих мобильных элементов. Выше было сказано о возможном влиянии происходящей с возрастом депрессии транспозонов на темп укорочения теломер (разд. 5.6), что определяет старение как биологический феномен.

6.10. Генные мутации

Мутация – это изменение генетического аппарата, которое может быть унаследовано дочерними клетками или потомками организма.

Мутации принято подразделять на спонтанные (самопроизвольно возникающие в течение всей жизни организма в условиях окружающей среды, являющихся нормальными для данного организма) и индуцированные (возникающие под воздействием неблагоприятных условий окружающей среды или в ходе экспериментов в лабораторных условиях). Частота возникновения спонтанных мутаций колеблется в пределах 10^{-9} – 10^{-12} на нуклеотид за клеточную генерацию.

В живой клетке постоянно происходят такие процессы, как репликация ДНК, репарация ДНК и генетическая рекомбинация, в ходе которых постоянно возникают мутации. К возникновению мутаций приводят спонтанные изменения химической структуры нуклеотидов, которые происходят при репликации. Так например, при дезаминировании цитозина в одной из цепей ДНК образуется урацил. В этом случае вместо канонической пары

оснований ГЦ появляется пара ГУ. В дальнейшем в процессе репликации в новую цепь комплементарно урацилу включается уже аденин, и образуется пара АУ, а в следующем цикле репликации она заменяется на каноническую пару АТ. Таким образом, происходит транзиция – точечная замена одного пиримидина на другой пиримидин. Аналогично происходит и замена одного пурина на другое пуриновое основание.

Из всех рекомбинационных процессов мутации чаще всего происходят в ходе неравного кроссинговера. Как правило, неравный кроссинговер происходит в тех участках хромосом, где локализуется несколько копий одного и того же гена, возникших в результате дупликации или мультипликации и сохранивших высокую степень гомологии. В результате неравного кроссинговера в одной из хромосом появляется делеция некоторого участка, а в другой – его дупликация.

В течение жизни любой клетки довольно часто происходят спонтанные повреждения ДНК. Для того чтобы устранять эти повреждения, существуют особые ферментные системы – системы репарации (разд. 6.7). Если по каким-либо причинам в работе систем репарации происходит сбой, возникают мутации. Мутации могут появляться и в генах, кодирующих сами ферменты систем репарации, что приводит к резкому повышению (мутаторный эффект) или снижению (антимутаторный эффект) частоты мутаций других генов. У человека известно такое заболевание, как пигментная ксеродерма, при котором под действием ультрафиолетового облучения возникают дерматиты, а позднее и злокачественные новообразования кожи. Причиной данного заболевания является мутация, в результате которой нарушается работа системы репарации.

Существенно увеличить частоту мутаций могут не только изменения в системах ферментов репарации клетки, но и многие другие факторы, которые называются мутагенными. Различают химические вещества (вызывающие мутации, например нитрозометилмочевина, этиленимин и др.), физические (ионизирующее и ультрафиолетовое излучения, высокая температура и т. д.) и биологические (ретровирусы, ретротранспозоны) мутагены.

Генные мутации встречаются чаще, чем другие типы мутаций. Генные мутации представляют собой замены, делеции и вставки одного или нескольких нуклеотидов, транслокации, дупликации и инверсии различных частей гена. Мутация, затрагивающая только один нуклеотид, называется точковой. Замена одного нуклеотида другим называется транзициями (замена пурина на пурин или пиримидина на пиримидин) или трансверсиями (замена пурина на пиримидин или наоборот). Последствия точковых мутаций могут быть различными. Если в результате замены нуклеотида смысл кодона сохраняется из-за вырожденности генетического кода, то такая замена называется синонимической. Нуклеотидная замена может изменить смысл кодона и привести к замене соответствующего данному кодону аминокислотного остатка в полипептидной цепи (миссенс-мутация). В результате замены одного нуклеотида возможна также преждевременная терминация трансляции из-за образования бессмысленного кодона: амбер – УАГ, охра – УАА или опал – УГА. Подобные мутации называются нонсенс-мутациями. Возможны также мутации, приводящие к замене стоп-кодонов на смысловые.

Из-за триплетности генетического кода, в случае если происходит делеция или вставка числа нуклеотидов, не кратного трем, происходит сдвиг рамки считывания, обесмысливающий трансляцию.

Следует различать первичную (прямую) мутацию и реверсию или обратную мутацию, т. е. такую мутацию, которая восстанавливает исходную структуру гена. Однако не всегда фенотипическая реверсия бывает обусловлена обратной мутацией. Подобное явление может быть обусловлено супрессорной мутацией, которая может произойти как в другой области того же самого гена (интрагенная супрессорная мутация), так и в другом неаллельном гене (экстрагенная супрессорная мутация). Некоторые мутации кардинально изменяют процессы, протекающие в клетке. Такая клетка, как правило, распознается системами контроля гомеостаза (постоянства внутренней сре-

ды организма), происходит запуск программ апоптоза (программируемой клеточной смерти), и клетка погибает. Если по каким-то причинам измененная клетка не была элиминирована, она дает начало новой популяции клеток с измененным генотипом и, как следствие, с новыми функциями. Если подобная мутация произошла в соматической клетке, то это может привести к развитию злокачественных или доброкачественных новообразований, если в генеративной клетке – к появлению новых организмов с совершенно иными свойствами.

Подавляющее большинство мутаций приводят к снижению жизнеспособности организмов и клеток вплоть до их гибели. Однако очень редко происходят мутации, которые приводят к появлению у мутантных особей полезных признаков и оказывают положительное влияние на приспособленность к условиям среды. Такие мутации являются средством адаптации клеток и организмов к условиям окружающей среды и называются адаптационными.

Мутации, затрагивающие «молчащие» участки генома, и синонимические нуклеотидные замены обычно не имеют фенотипического проявления. Их можно обнаружить только с применением современных молекулярно-биологических методов. Принимая во внимание тот факт, что подавляющее большинство мутаций являются спонтанными, частоту их возникновения можно считать величиной постоянной. На этом основано изучение мутаций в «молчащих» генах с целью исследования филогении (путей эволюции) различных видов, в том числе и человека. Результаты исследований мутаций, затрагивающих митохондриальный геном и наследующихся исключительно по материнской линии, а также мутаций, локализующихся в Y-хромосоме, которые наследуются только по мужской линии, находят широкое применение в эволюционной биологии и этногенетике.

Контрольные вопросы и задания

1. Установите соответствие между понятиями, содержащимися в следующих столбцах. Для этого рядом с цифрой первого столбца поставьте букву соответствующего понятия из второго столбца.

- | | |
|---------------|-----------------|
| 1. хромосома | а) транзиция |
| 2. репликация | б) теломера |
| 3. мутация | в) РНК-затравка |

2. Завершите фразу, выбрав правильное суждение из перечисленных вариантов:

Транскрипция – это...

- а) изменение числа хромосом, кратное гаплоидному;
- б) мутация замены одного нуклеотида другим в составе ДНК;
- в) процесс синтеза информационной РНК на матрице ДНК;
- г) один из видов взаимодействия неаллельных генов;

3. Определите правильность следующей фразы:

Интроны – это нетранслируемые участки мРНК, которые вырезаются при ее созревании.

4. Установите соответствие между понятиями, содержащимися в следующих столбцах. Для этого рядом с цифрой первого столбца поставьте букву соответствующего понятия из второго столбца.

- | | |
|----------------|------------------|
| 1. трансляция | а) доминирование |
| 2. трансдукция | б) рибосома |
| 3. аллель | в) вирусы |

5. Исключите лишнее понятие в приведенном ряду. Укажите обобщающее слово данного ряда:

РНК-полимераза, репликация, ДНК-полимераза, фрагменты Оказаки, топоизомераза, рибосома.

6. Установите соответствие между понятиями, содержащимися в следующих столбцах. Для этого рядом с цифрой первого столбца поставьте букву соответствующего понятия из второго столбца.

- | | |
|-------------|-----------------|
| 1. рибосома | а) хроматин |
| 2. промотор | б) белок |
| 3. гистоны | в) транскрипция |

7. Продолжите фразу:

В состав ДНК входят следующие нуклеотиды....

8. Закончите фразу:

Рибосомы участвуют в процессе...

Глава 7. Основы молекулярной генетики

7.1. Геномика, транскриптомика, протеомика

Геномика – направление молекулярной генетики, изучающее структурно-функциональную организацию генов и геномов живых организмов.

Геномика сформировалась как особое направление в период создания первых проектов по секвенированию геномов некоторых видов живых организмов в 1980–1990-х гг. Первым был полностью секвенирован геном бактериофага Ф-Х174 (5 368 п.н.). Это событие произошло в 1977 г., затем в 1995 г. был секвенирован геном бактерии *Haemophilus influenzae* (1,8 млн п.н.). После этого были получены полные сиквенсы геномов еще нескольких видов, включая геном человека (2001 г. – первый черновой вариант, 2003 г. – первый заверченный релиз). Последний по времени релиз – 37.1 – опубликован в августе 2009 г. В нем аннотировано 34533 гена. Хотелось бы отметить, что развитие геномики стало возможно не только благодаря совершенствованию биологических и физико-химических методов, но и в связи с появлением более мощной вычислительной техники, которая позволила работать с огромными массивами данных, и более совершенного программного обеспечения.

Протяженность геномов у живых организмов очень часто измеряется миллиардами пар оснований (геном человека состоит из 3 млрд п. н.), что предполагает необходимость применения существенных компьютерной мощностей для адекватной обработки содержащейся в них информации.

Структурная геномика – раздел геномики, изучающий структуру генов и геномов. Особое внимание уделяется внутреннему строению гена, составу и расположению регуляторных последовательностей, особенностям молекулярной организации хромосом и хромосомных районов, общим принципам структурирования последовательностей геномов.

Функциональная геномика изучает механизмы работы генов и других функционально активных элементов генома. Процессы экспрессии генов и ее регуляции при помощи близких и удаленных элементов генома находятся в центре внимания этой дисциплины.

Сравнительная (эволюционная) геномика – раздел геномики, предметом которого являются эволюционные отношения генов и геномов. Вопросы гомологии (общности происхождения двух или более структур), эволюционного консерватизма и дивергенции (расхождения в процессе эволюции) наиболее характерны для этого раздела.

Транскриптомика – как следует из ее названия – наука о транскриптоме. Транскриптомом называют совокупность всех транскриптов, которые синтезируются в одной клетке или группе клеток (в том числе мРНК и некодирующие РНК). Понятие «транскриптом» может обозначать полный набор транскриптов, синтезируемых в данном организме, или специфический набор транскриптов (молекул РНК), представленный в клетках определенного типа.

Если геном у всех клеток одной линии, как правило, одинаков, то транскриптом может быть весьма изменчив и зависит от условий окружающей среды. Понятие «транскриптом» отражает профиль экспрессии генов в данный момент времени, поскольку включает в себя все транскрипты данной клетки. Наиболее часто в экспериментах по изучению транскриптома используют биочипы (метод ДНК-микроаррей, позволяющий анализировать уровни транскрипции десятков тысяч генов одновременно) и полимеразную цепную реакцию в реальном времени, которая позволяет давать точную количественную оценку экспрессии отдельных генов. Существуют базы данных по профилям экспрессии тысяч генов в различных органах и тканях при разных воздействиях (например <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/genes-expression>).

Протеомика – это наука, изучающая белки и их взаимодействия в живых организмах. Учёные, работающие в области протеомики, исследуют биосинтез, посттрансляционные модификации, взаимодействия белков друг с другом и с другими веществами.

Белки служат для выполнения огромного числа функций в организме, таких, например, как:

- **энзимная (ферментная).** Многие белки служат катализаторами биохимических реакций, протекающих в живых организмах;
- **транспортная.** Некоторые белки, такие как гемоглобин, трансферрин и др., переносят различные вещества от одних клеток, тканей и органов к другим;
- **структурная.** Белки входят в состав подавляющего большинства структурных компонентов клеток и тканей живых организмов. Например, коллаген и эластин обеспечивают фиброзную основу соединительных тканей у животных;
- **резервная (запасная)** Некоторые белки, такие как казеин, являются главным источником аминокислот для организмов детёнышей млекопитающих;
- **регуляторная.** Гормоны, принимающие участие в регуляции многих процессов, протекающих в живом организме, по своей химической природе являются белками;
- **рецепторная.** Существуют белки, встроенные в мембраны клеток, которые распознают химические сигналы, передаваемые другими клетками;
- **моторная.** Сократимые белки, такие как миозин, который играет большую роль в движении мышц;
- **защитная.** Белками являются антитела, которые защищают организм от болезней.

Белки синтезируются через посредника – рибонуклеиновую кислоту (РНК), структура которой определяется последовательностью ДНК. Процесс реализации генетической информации о структуре белка или РНК называется экспрессией. Молекулы белков представляет собой высокомолекулярные органические вещества, состоящие из одной или нескольких аминокислотных цепочек. Порядок, в котором выстраиваются аминокислоты, диктуется последовательностью нуклеотидов в ДНК.

Наиболее крупное достижение последних лет – картирование генома человека. По данным последнего релиза (37.1 от августа 2009 г.) в аутосомах находится 32593 генов, в половых

хромосомах – 2003 гена и в митохондриях – 37 генов. Количество белков в человеческом организме примерно в десять раз больше количества генов. По оценкам большинства авторов, их насчитывается более 300 000, а число белок-белковых взаимодействий и вовсе не поддается подсчету. Наиболее известная база данных по протеомике человека: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>.

Многие болезни могут быть прослежены до изменений, происходящих на уровне белков. К примеру, известно, что при серповидноклеточной анемии аномальный белок гемоглобин вызывает изменение формы красных кровяных телец. Аномальные эритроциты имеют серповидную форму. Серповидноклеточная анемия обусловлена мутацией, приводящей к замене глутаминовой кислоты на валин в бета-цепи гемоглобина (гемоглобин S). Это заболевание является классическим примером приспособительного значения мутаций – гетерозиготы по замене глутаминовой кислоты на валин в бета-цепи гемоглобина более устойчивы к малярии, поэтому частота ее встречаемости выше в географических районах распространения малярийного плазмодия.

Часто после синтеза (трансляции), для того чтобы выполнять определенные функции в организме, белки требуют модификации. Например, белки, которые вызывают образование кровяных тромбов, остаются неактивными до тех пор, пока не претерпевают соответствующих изменений. Следовательно, неправильная посттрансляционная модификация также является причиной неправильного функционирования белков.

Причина многих заболеваний человека – модификации белков и изменения характера их взаимодействий. Результаты исследований в области протеомики в последние годы все чаще применяются в биофармакологии, которая получила благодаря этому надежный теоретический фундамент. Сегодня более 95 % всех имеющихся на рынке лекарственных средств оказывают свое действие именно на белки. Системные подходы протеомики помогают гораздо эффективнее идентифицировать и оценивать новые целевые белки, а следовательно, ускорить разработку новых диагностических систем и терапевтических средств и сделать их более эффективными.

7.2. Клонирование нуклеиновых кислот

Клонирование нуклеиновых кислот – получение большого числа копий интересующей последовательности в форме воспроизводимых в живых организмах структур – вирусов, плазмид, искусственных хромосом. Введение в организм чужеродных генов обычно используют для получения продукта этого гена — РНК или, чаще всего, белка. Принципиально возможно применение метода для генной терапии.

Клонировать можно как отдельные фрагменты генома, так и мРНК. В последнем случае применяют специальный фермент – обратную транскриптазу, которая позволяет получить ДНК-копию с РНК-матрицы. Полученные путем обратной транскрипции молекулы ДНК называют комплементарной ДНК (кДНК). Их и лигируют в векторы.

Клоны, полученные из отдельных тканей, хромосом или геномов, группируют в тканеспецифические, хромосомоспецифические или геномные библиотеки.

7.3 Гибридизация нуклеиновых кислот

Гибридизация нуклеиновых кислот – это образование *in vitro* двуцепочечных молекул нуклеиновых кислот из комплементарных одноцепочечных молекул. Если гибридизуемые молекулы полностью комплементарны, процесс происходит достаточно быстро. При гомологии (общем происхождении) изучаемых последовательностей, которая выражается в определенном проценте идентичности оснований, процесс может потребовать варьирования условий гибридизации. Возможна гибридизация ДНК-ДНК и ДНК-РНК. Процесс гибридизации ДНК/ДНК проводится следующим образом. Двуцепочечную ДНК разогревают в соответствующем буфере. На этом этапе водородные связи между комплементарными азотистыми основаниями становятся термодинамически невыгодными, и цепочки расходятся. Происходит денатурация ДНК. Препарат денатурированной ДНК затем смешивается с другой денатурированной ДНК. Далее эта смесь медленно охлаждается. В это время одноцепочечные ДНК отжигаются друг на друга (образуются водород-

ные связи между комплементарными основаниями) и образуется гибридная молекула ДНК.

Анализ скорости ренатурации одноцепочечных ДНК служит для оценки сходства и различия последовательностей ДНК разных видов живых организмов или разных особей одного вида.

Дот-блот-гибридизация проводится в одной точке. На фильтр наносят исследуемый образец. ДНК-зонд метят радиоактивно, иммуноферментно или иммунофлуоресцентно. Наличие положительного гибридизационного сигнала свидетельствует о наличии в образце последовательности, полностью или частично идентичной молекуле ДНК-зонда.

Блот-гибридизация по Саузерну служит для выявления определенной последовательности ДНК (в образце), которая полностью или частично идентична молекуле ДНК-зонда. Этот метод сочетает электрофорез в агарозном геле для фракционирования ДНК с методами переноса полученных фрагментов ДНК на мембранный фильтр для гибридизации. Метод получил свое название по имени изобретателя, английского биолога Э. Саузерна.

Нозерн блот-гибридизация (в английском названии метода – игра слов southern – южный, northern – северный) подобна блот-гибридизации по Саузерну, но в качестве мишени используют кДНК. Метод служил для выявления и количественной оценки уровня транскрипции отдельных генов до распространения метода ПЦР с обратной транскрипцией.

7.4. Геномные библиотеки

Возможность быстрого получения препаративных количеств ДНК протяженных (более 30 т.п.н.) фрагментов генома является необходимым условием большинства экспериментов по молекулярно-генетическому и цитогенетическому анализу геномов. Гридированные геномные библиотеки, т. е. имеющие адресное указание индивидуальных клонов, позволяют получать протяженные фрагменты ДНК, содержащие интересующую исследователей последовательность, и широко используются для анализа генома с использованием различных подходов.

Первая генетическая система для масштабного клонирования протяженных фрагментов генома была создана Бурке в 1987 г. Она была основана на искусственных хромосомах дрожжей (YACs), включающих центромеру, теломеры, автономно-реплицирующиеся последовательности, сайт клонирования и гены селективных маркеров. Система позволяла клонировать нуклеотидные последовательности до 1000 т.п.н. Поскольку в начале 90-х гг. интенсивно проводилось секвенирование генома человека, такие системы были быстро востребованы и использованы для создания геномных библиотек. Однако существенные недостатки этого рода библиотек – высокий уровень химеризма (когда в одном клоне объединены разные участки генома), нестабильность геномной вставки и трудность приготовления препаративных количеств клонированных последовательностей ДНК – не позволили их использовать в качестве основного инструмента геномного клонирования. Большое количество tandemных (ориентированных в одном направлении) повторов генома млекопитающих приводило в дрожжевой системе к сайт-специфической рекомбинации и потере фрагментов вставки, либо к образованию химерных клонов, т. е. клонов, содержащих фрагменты ДНК из разных областей генома-донора. Цитологически химерные клоны выявляются при гибридизации *in situ* вследствие локализации в двух и более сайтах.

Поскольку прокариотические системы рекомбинации оставляют меньше вероятности нежелательных обменов, кроме того эписомы прокариот отличаются относительной стабильностью и могут существовать в суперскрученной форме, бактерии оказались более привлекательными как организмы-хозяева для геномных клонов. Плазмидные векторы не только проще хромосомных эукариотических векторов (не содержат центромеры, теломеров, и следовательно, конструирование библиотек с ними менее трудоемко), но и позволяют существенно упростить процедуру выделения клонированной ДНК из основанных на них клонов путем полного разрушения хромосомной ДНК.

Первые геномные банки с использованием клеток кишечной палочки *Escherichia coli* были основаны на группе векторов – производных фага лямбда. Существуют фаговые векторы традиционной структуры, представляющие собой молекулы ДНК, способные только к литическому расщеплению *in vitro*. Космидные векторы формально являются дефектными фагами – плазмидами разных типов, содержащими *cos*-участки фага лямбда и не способными к лизису. Наконец, фагмидный (фаг + плазида) вектор, существенной особенностью которого является способность к литическому развитию *in vivo*, поддерживается в виде плазмиды. Все подобные конструкции широко используются для получения клонотек и банков генов. Их общим недостатком является довольно большое число клонов (до 10^6), необходимое для уверенного представления любого фрагмента генома млекопитающих или птиц при сравнительно небольшом размере вставки – 20–40 т.п.н.

Особо стоит упомянуть космиды – плазмиды, содержащие сегмент ДНК фага λ с соединенными липкими концами (*cos*-сайты). Важной чертой большинства космидных векторов для клонирования является их способность включать вставки до 45 т.п.н. Если кольцевую космидную ДНК разрезать по какому-то уникальному сайту, смешать с фрагментами ДНК, содержащими липкие концы, и произвести отжиг, то образуются длинные конкатемеры (молекулы, состоящие из крупных повторяющихся блоков). При смешении этих конкатемеров с белками, осуществляющими упаковку фага λ , они разрезаются по *cos*-сайтам, и ДНК упаковывается в головку фага. Этот процесс позволяет отобрать вставки большой протяженности, так как для того чтобы ДНК упаковывалась в головку фага, расстояние между *cos*-сайтами должно быть 38–52 т.п.н. Такая смесь может содержать фрагменты вовсе без вставки или с несколькими повторяющимися вставками, что отражается на качестве полученной библиотеки и затрудняет ее применение для геномного анализа. Реципиентные клетки приобретают упакованные космиды в результате инфицирования «фальшивыми»

фаговыми частицами, причем этот процесс более эффективен, чем трансфекция плазмидной ДНК. Попав в клетку-хозяина, рекомбинантная ДНК амплифицируется и сохраняется в виде плазмиды. Полученные рекомбинантные клоны могут быть гридированы – выращены на платах с указанием координат каждого клона. Получение отпечатков (реплик) на нитроцеллюлозных или других фильтрах для переноса клонов с последующим разрушением клеточных стенок бактерий и отмыванием белков позволяет проводить скринирование таких библиотек при помощи обычной дот-блот ДНК-ДНК гибридизации. Недостатком космидных геномных библиотек является относительно (по сравнению с искусственными хромосомами дрожжей) небольшая величина вставки (до 45 т.п.н.) и, следовательно, большой объем библиотеки (для геномов млекопитающих около 2×10^5 клонов). Для того чтобы совместить преимущества космидных библиотек (высокая стабильность ДНК-клонов, относительно низкий уровень химеризма, простота конструирования, удобство выделения ДНК) и дрожжевых библиотек (большая длина вставки и компактность всей библиотеки), были разработаны две системы клонирования – на основе искусственных хромосом бактерий (ВАС) и искусственных хромосом фага Р1 (РАС). Впервые РАС вектор (pCYPAC-1) был использован для переноса рекомбинантной ДНК в клетки *E. coli* при помощи электропорации. Разделенные при помощи пульс-электрофореза фрагменты геномной ДНК человека были упакованы в головки частиц бактериофага Р1. Заражение такими фаговыми частицами штамма *E. coli*, экспрессирующего рекомбиназу Cre, привело к возникновению эписомных копий генома рекомбинантных фаговых частиц. Полученная геномная библиотека содержала 15000 клонов со средним размером вставки 130–150 т.п.н. Тридцать четыре клон были гибридизованы на митотических хромосомах методом FISH, при этом не было выявлено ни одного случая химеризма. Продолжительное культивирование бактерий не выявило нестабильности вставки на примере 20 клонов.

Искусственные хромосомы бактерий (BACs) основаны на F-факторе (факторе фертильности) – низкокопийной плазмиде, которая существует в бактериальных клетках в суперскрученной кольцевой форме и может включать вставку до 500 т.п.н. Репликация фактора фертильности жестко контролируется клеточными механизмами, что существенно снижает уровень рекомбинации в эписомах этого рода. Кроме того, геномная ДНК вида-донора находится практически все время в суперскрученном состоянии, следовательно, вероятность нежелательных обменов между фрагментами вставки теоретически приближается к нулю. Первая такая библиотека была получена на основе вектора pBAC108L, включающего фактор фертильности и cosN-сайт. Размер вставки варьировал от 10 до 300 т.п.н., составляя в среднем 100 т.п.н. Стабильность вставки (по признаку сохранения профиля рестрикционных фрагментов) подтверждена в течение 100 поколений бактериальных клеток. Проверка клонов на химеризм методом гибридизации *in situ* позволила обнаружить только один случай обмена из 28 случайно выбранных трансформантов. Дальнейшие работы с использованием этой библиотеки также показали низкую частоту транслокаций. Следует отметить в среднем меньшую длину клонированных фрагментов в системах искусственных хромосом бактерий по сравнению с дрожжевыми и основанными на бактериофаге P1. Однако указанные выше недостатки дрожжевых систем не позволяют им конкурировать с бактериальными. Преимуществом же BAC-библиотек перед PAC-библиотеками является относительная простота их конструирования: исключается использование бактериофагов, перенос донорной ДНК проводится при помощи обычной трансформации. Таким образом, оптимальными системами для клонирования протяженных геномных последовательностей более 50 т.п.н. признаны искусственные хромосомы бактерий, а для фрагментов менее 50 т.п.н. (которые имеют преимущества для использования в некоторых исследованиях геномов) таковыми остаются космиды.

7.5. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) применяется при необходимости многократного увеличения малых концентраций отдельных фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале (образце). Применение ПЦР настолько многообразно, что одно перечисление способов приложения этого метода может занять существенный объем текста. В наше время в принципе любую последовательность ДНК можно получить в препаративных количествах, зная только по 20–30 нуклеотидов на ее границах.

Принцип полимеразной цепной реакции заключается в многократном избирательном копировании (амплификации) определённого участка ДНК, проводимом *in vitro* с помощью особой ДНК-полимеразы (например, полимеразы *taq*), выделенной из экстремально термофильных бактерий (рис. 74). Особая термостабильность этого фермента позволяет проводить денатурацию двунитевой ДНК при 95 °С без потери активности. Условия реакции подбираются так, чтобы амплифицировался только заданный фрагмент ДНК и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце. После денатурации ДНК короткие (18–30 н.п.) синтетические олигонуклеотиды, называемые праймерами, гибридизуются ДНК-матрицей согласно принципу комплементарности пар оснований, что обуславливает специфичность ПЦР. Температура на этой стадии 50–65 °С, точная температура зависит от последовательностей праймеров исходя из их нуклеотидного состава. Эта стадия называется отжиг или гибридизация. Каждый из праймеров комплементарен участку одной из цепей двуцепочечной матрицы и ограничивает начало и конец амплифицируемого фрагмента. Затем температуру доводят до 72 °С – оптимума для работы *taq*-полимеразы. Это – стадия полимеризации. Денатурацию, отжиг и полимеризацию (каждая проводится от нескольких секунд до полутора минут) повторяют 20–35 раз. Таким образом, число копий амплифицируемого фрагмента увеличивается в 2^n раз, где n – число циклов. Затем реакционную смесь

инкубируют несколько минут при 72 °С, чтобы полимераза смогла достроить недополимеризованные участки – стадия элонгации. Заключительная стадия – хранение – проходит при 4 °С. Визуализацию результатов обычно проводят путем электрофореза в агарозном геле с окраской ДНК флуорохромом этидиум бромид (рис. 75).

Для анализа экспрессии генов применяют РТ-ПЦР – полимеразную цепную реакцию на матрице кДНК, полученной путем обратной транскрипции мРНК.

С использованием специальных приборов ПЦР можно наблюдать в режиме реального времени (рис. 76). Существует несколько вариантов проведения такой реакции. Один из них – ПЦР, в которой в реакционную смесь, помимо традиционных компонентов, добавляют интеркалирующий краситель SYBR GREEN. Сканирующий луч измеряет уровень флуоресценции красителя, связывающегося только с двунитевой ДНК, который прямо пропорционален числу копий амплифицированного фрагмента. Определение номера цикла, на котором уровень флуоресценции достоверно превысит фоновый (точки *Ct*), позволяет проводить количественные сравнения ДНК в различных образцах (рис. 77). Поскольку для каждого фрагмента существуют своя температура денатурации (плавления), наличие только одного пика на кривой плавления свидетельствует о специфичности реакции (рис. 78).

Отличие ПЦР от процесса репликации, проходящего в клетках живых организмов, состоит в том, что полимеразная цепная реакция позволяет амплифицировать сравнительно короткие участки ДНК (не более 3000 пар оснований). При использовании смеси нескольких полимераз, например *Taq* и *Pvu*, при определенных условиях возможна амплификация фрагментов ДНК длиной 20–40 т.п.н., однако эти фрагменты всё равно значительно короче хромосомной ДНК эукариотической клетки.

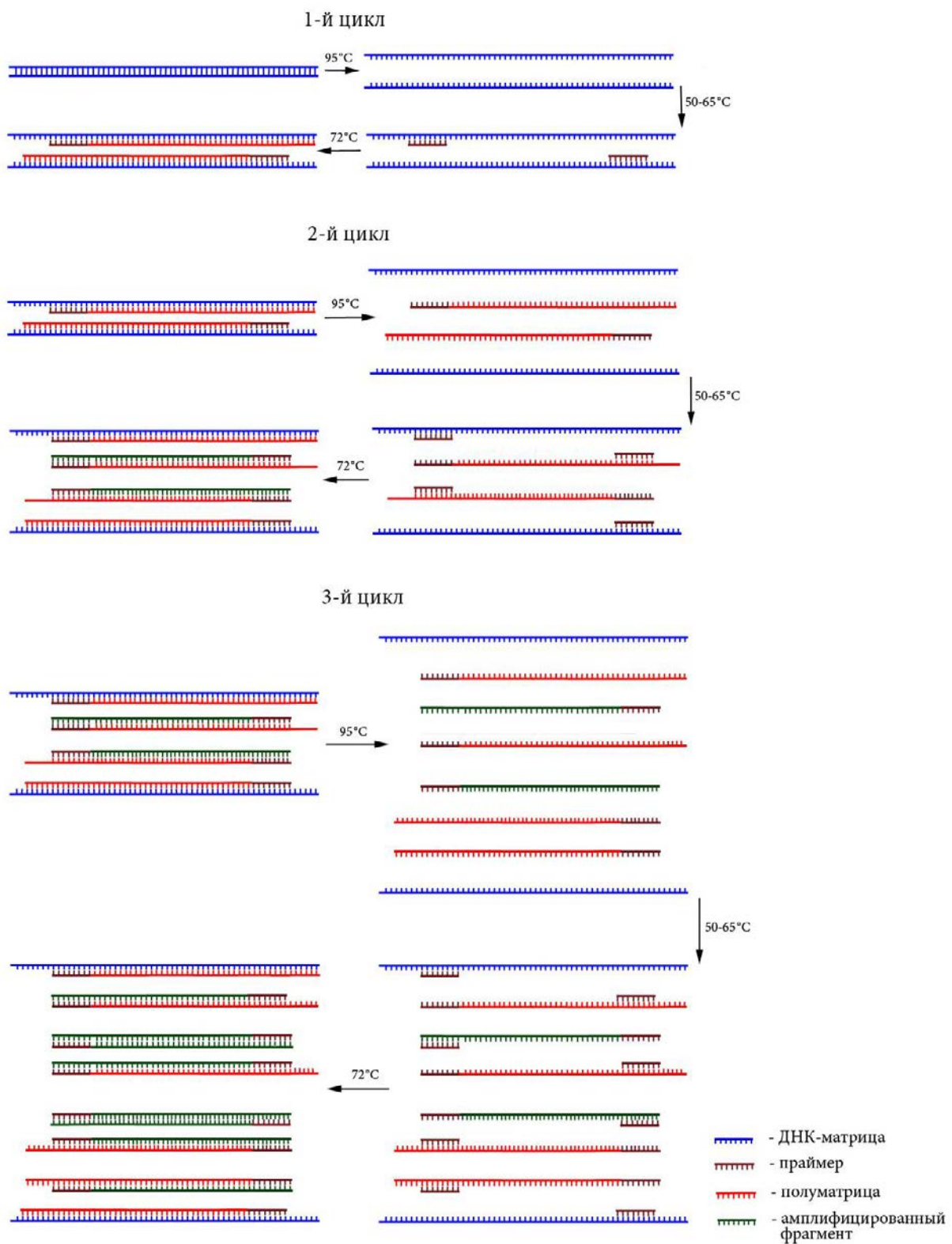


Рис. 74. Схема ПЦР

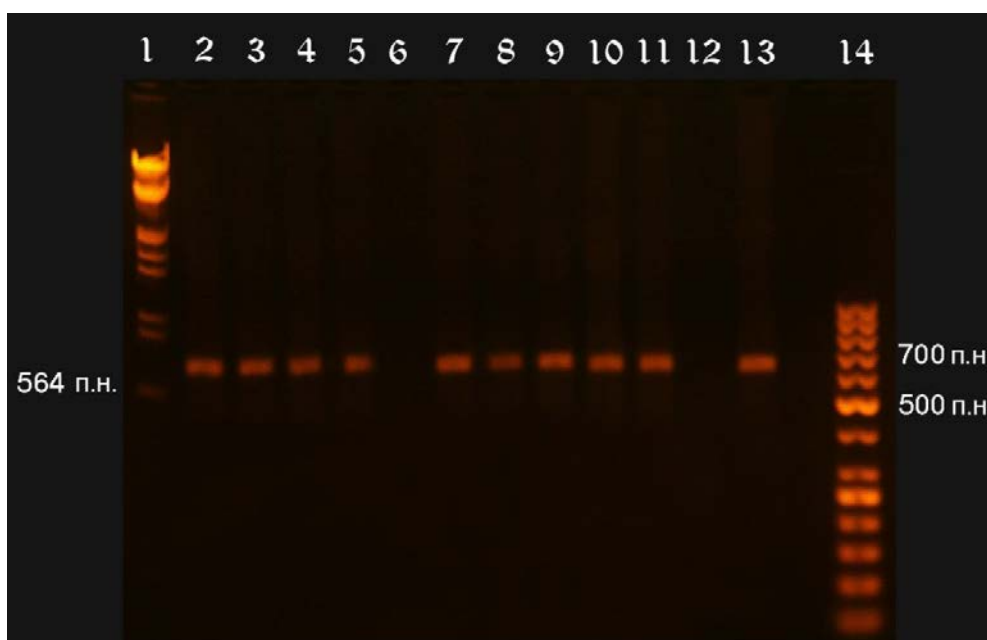


Рис.75. Электрофореграмма результатов ПЦР (фото автора)



Рис. 76. Амплификатор iQ (Biorad).

Прибор может быть использован как для ПЦР в реальном времени, так и для обычной (конвенционной) ПЦР

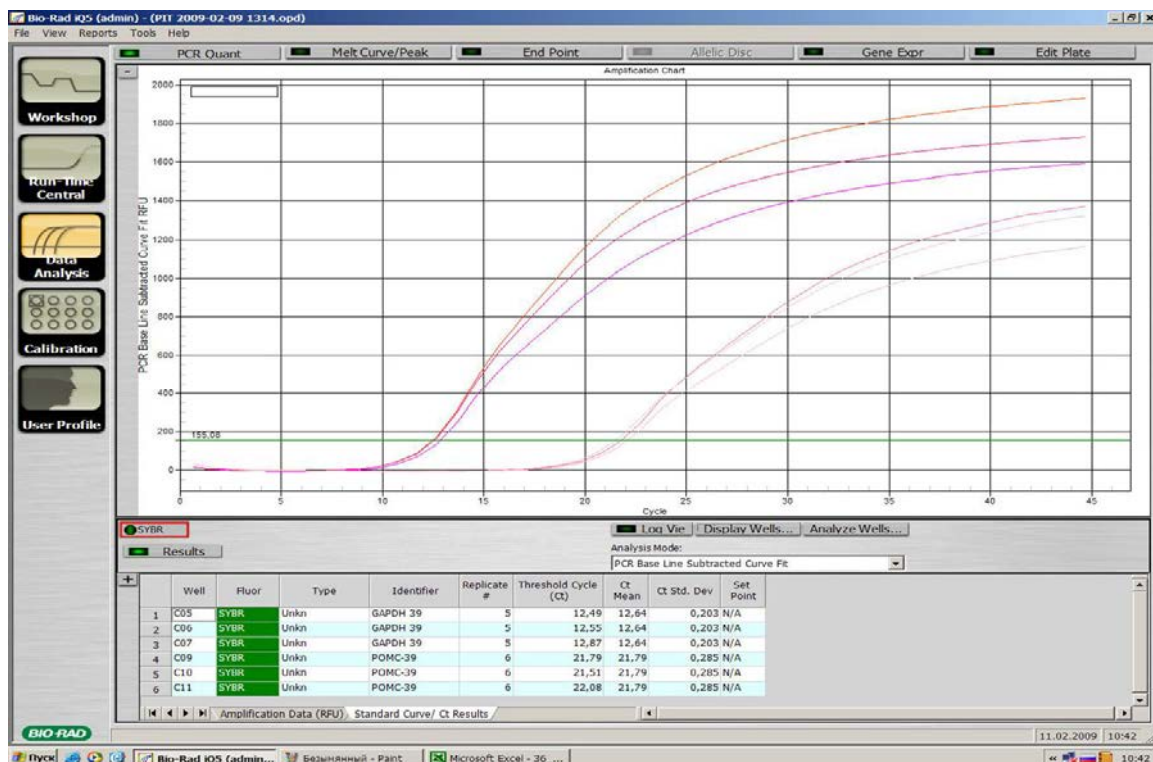


Рис. 77. Примеры графиков количественного анализа нуклеиновых кислот при помощи ПЦР в реальном времени

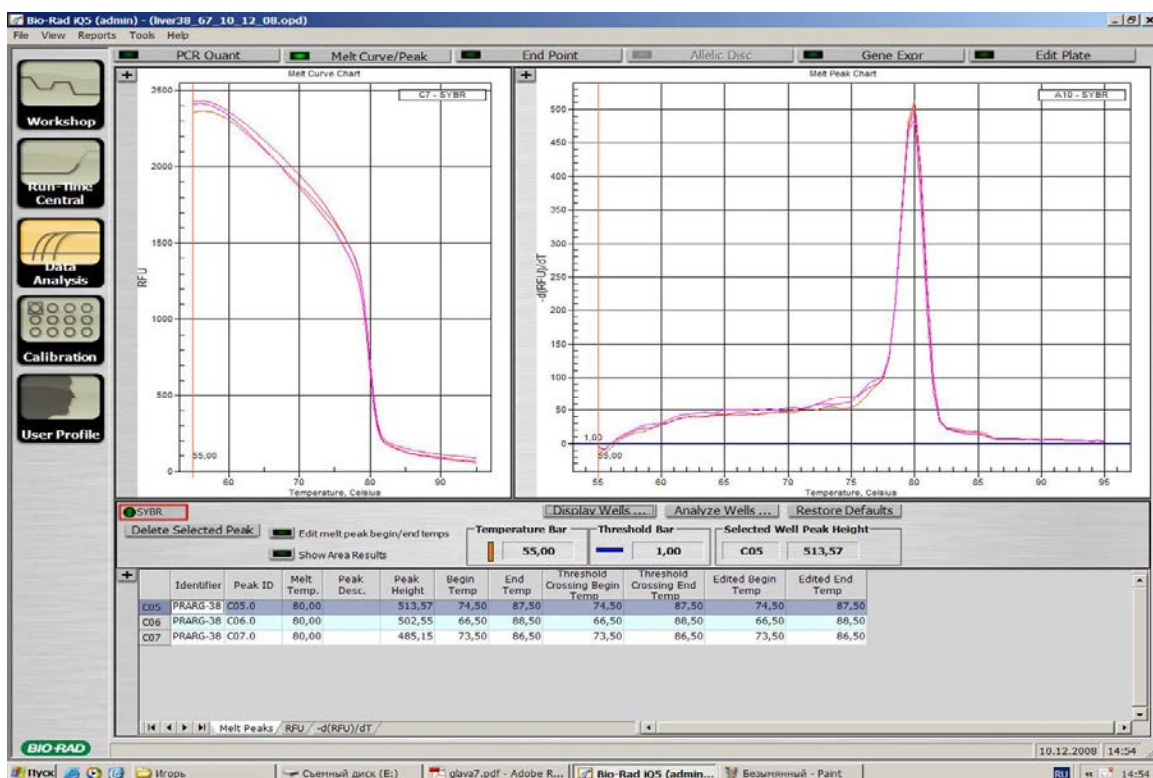


Рис. 78. Примеры кривых плавления при ПЦР в реальном времени

7.6. Секвенирование ДНК

Секвенирование нуклеиновых кислот – определение их первичной нуклеотидной последовательности.

В настоящее время для секвенирования широко используется дидезоксинуклеотидный метод, или метод «обрыва цепи», разработанный Ф. Сэнгером в 1977 г. До начала секвенирования производят ПЦР-амплификацию участка ДНК, последовательность которого требуется определить, с использованием в качестве предшественников молекулы дидезоксинуклеозидтрифосфатов (ддНТФ). При дидезоксисеквенировании происходит гибридизация синтетического олигонуклеотида-праймера длиной 17–25 п.н., поставляющего 3'-гидроксильную группу для инициации синтеза цепи, комплементарной матрице, со специфическим участком одной из цепей секвенируемого фрагмента. Раствор с праймером распределяют по четырем пробиркам, в каждой из которых находятся четыре дезоксинуклеотида – дАТФ, дЦТФ, дГТФ и дТТФ (один из них – меченый радиоактивным изотопом) – и один из четырех 2',3'-дидезоксинуклеотидов (ддАТФ, ддТТФ, ддГТФ или ддЦТФ). Затем проводят один цикл амплификации. Дидезоксинуклеотид включается по всем позициям в смеси растущих цепей, и после его присоединения рост цепи сразу останавливается. В результате этого в каждой из четырех пробирок образуется уникальный набор полинуклеотидов разной длины. В четырех пробирках можно найти последовательности ДНК, различающиеся на 1 нуклеотид. Далее в пробирки добавляют формамид для денатурации фрагментов ДНК и проводят электрофорез в полиакриламидном геле на четырех дорожках. После разделения фрагментов ДНК проводят радиоавтографию, которая позволяет «прочитать» нуклеотидную последовательность секвенируемого сегмента ДНК (рис. 79).

В настоящее время дидезоксинуклеотиды метят четырьмя разными флуоресцентными красителями и проводят ПЦР в одной пробирке. Затем во время электрофореза в полиакриламидном геле луч лазера в определенном месте геля возбуждает флуоресценцию красителей, и детектор определяет, какой нуклеотид в настоящий момент мигрирует через гель. Современные приборы используют для секвенирования ДНК капиллярный электрофорез (рис. 80).

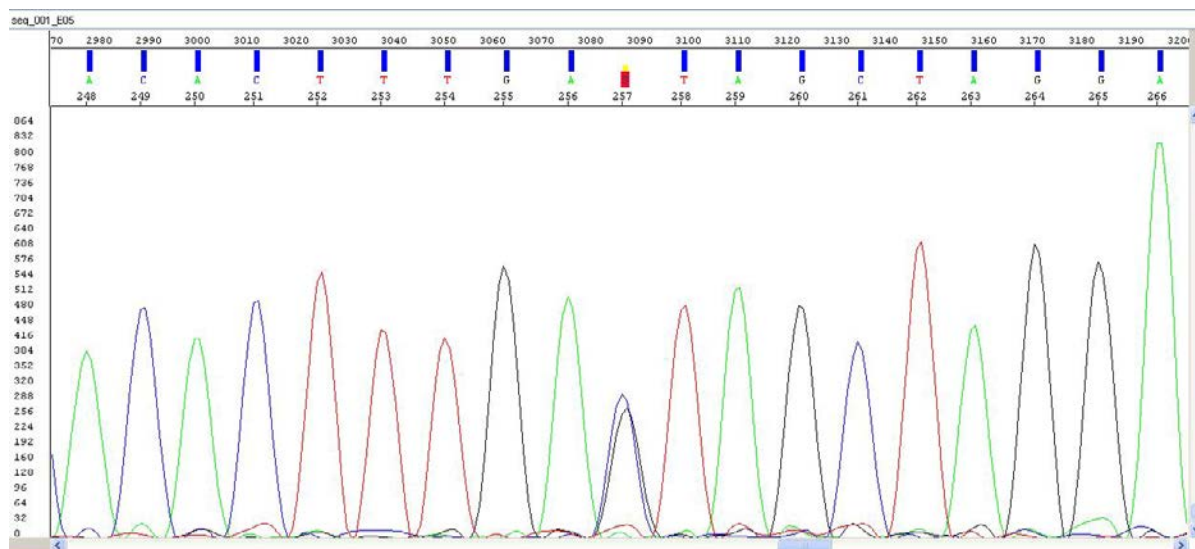


Рис. 79. Электрофореграмма результатов секвенирования фрагмента ДНК. Буквами обозначены соответствующие нуклеотиды: А – аденин, С – цитозин, Т – тимин, G – гуанин, символ S обозначает вариант мононуклеотидного полиморфного сайта (SNP) цитозин – гуанин



Рис. 80. Генетический анализатор AB 3130 (Applied Biosystems). Прибор используют для секвенирования и генотипирования по молекулярным маркерам

7.7. Сборка сиквенсов геномов

Метод дробовика (шотган-секвенирование/клонирование) может быть применен для сборки сиквенсов протяженных фрагментов ДНК, в том числе хромосом и геномов. В этом случае ДНК случайным образом фрагментируют. Полученные мелкие сегменты секвенируют обычными методами, например методом Сэнгера. Полученные последовательности перекрывающихся случайных фрагментов ДНК собирают с помощью специальных программ в одну большую последовательность. Существенную трудность при сборке представляют повторяющиеся последовательности ДНК, так как они имеют участки перекрывания с большим числом фрагментов. Для геномов прокариот и низших эукариот метод дробовика оказался подходящим. Геном человека содержит огромное количество (больше половины) разного типа повторяющихся последовательностей. Поэтому для получения совершенной сборки необходимо применение протяженных геномных клонов.

Сборка при помощи протяженных геномных клонов проводится в несколько этапов. Вначале необходимо создать несколько геномных библиотек с покрытием 5–10 эквивалентов генома (разд. 7.4). Затем клоны организуют в контиги (рис. 81). Контиг – это совокупность взаимно перекрывающихся геномных клонов. Для сборки контигов обычно используют геномный фингерпринтинг. Этот метод подразумевает разрезание ДНК-клонов специальными ферментами – рестриктазами и блот-гибридизацию по Саузерну с использованием в качестве зондов минисателлитных последовательностей (небольших повторов с повторяющейся единицей 7 и более нуклеотидов, имеющих более 1000 сайтов локализации в геноме человека). В результате получается индивидуальный набор гибридизующихся с зондом фрагментов для каждого клона. При этом совпадение длин нескольких фрагментов двух клонов свидетельствует о наличии участка перекрывания. Парное определение участков перекрывания позволяет получить контиг, соответствующий достаточно протяженному участку хромосомы. Затем методом FISH (разд. 5.5) определяют локализацию контигов на хромосоме.

Протяженные геномные клоны фрагментируют с использованием рестриктаз. Полученные последовательности длиной 500–700 п.н. встраивают в плазмидные векторы. Эта процедура называется субклонированием. Затем субклонированные последовательности секвенируют и при помощи компьютерных программ собирают сиквенс всего геномного клона. Объединив сиквенсы геномных клонов, получают сиквенсы контигов, а объединив последние – сиквенсы хромосом (рис. 82). Следует отметить, что некоторые районы хромосом, состоящие почти исключительно из повторов (например, центромерные районы), технически не поддаются клонированию и секвенированию и образуют пробелы (гэпы) на картах геномов.

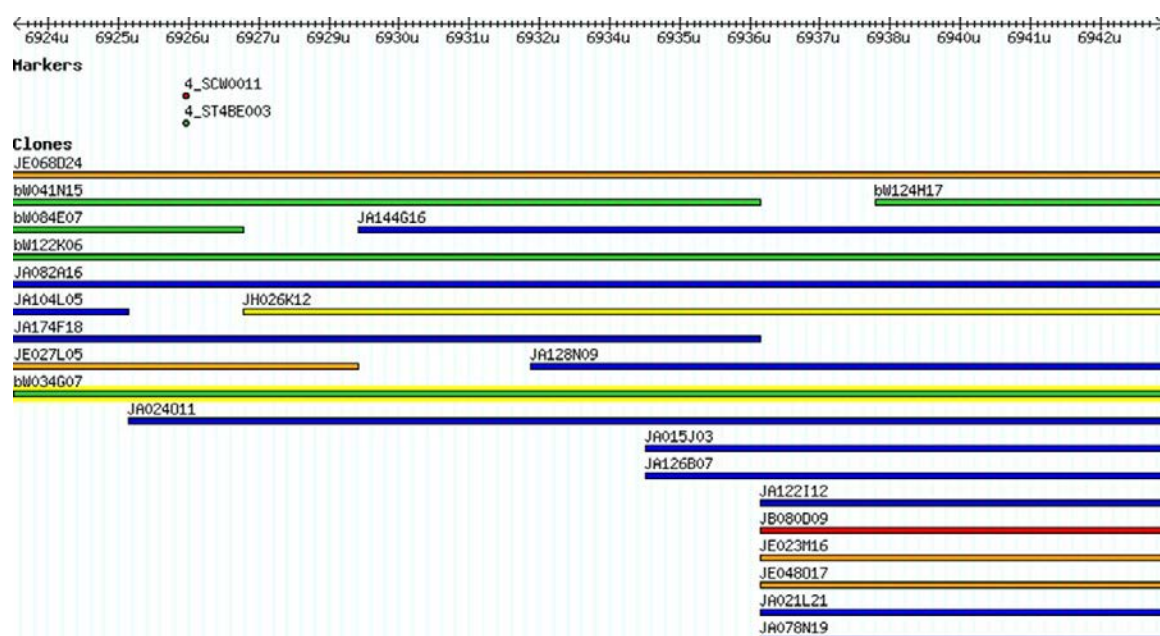


Рис. 81. Образец контига геномных клонов

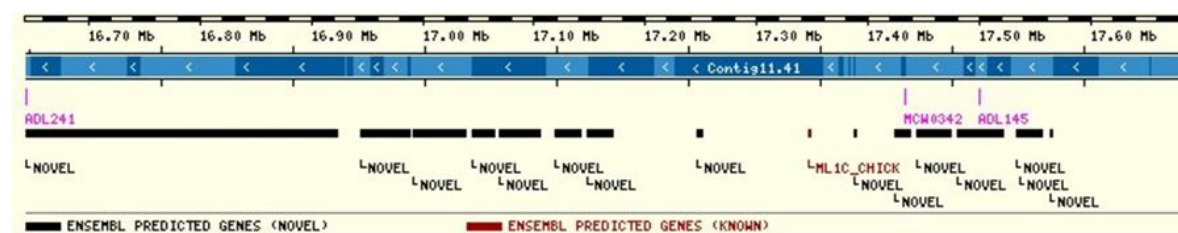


Рис. 82. Фрагмент геномной последовательности

7.8. Биоинформатика и системная биология

Биоинформатика или вычислительная биология – один из разделов биологии, предметом которого являются молекулярные процессы, но в данном случае исследования проводятся не *in vitro*, а *in silico*, т. е. не в пробирке, а при помощи компьютеров.

Под биоинформатикой понимают любое использование компьютеров и программного обеспечения для анализа биологических данных. На практике часто это понятие сужается и включает в себя только использование компьютеров для обработки экспериментальных данных по структуре биологических макромолекул (белков и нуклеиновых кислот) с целью получения биологически значимой информации.

В биоинформатике используются методы прикладной математики, статистики и информатики. Исследования в области биоинформатики и системной биологии зачастую пересекаются. Основные усилия исследователей, работающих в области биоинформатики, направлены на изучение геномов, анализ и предсказание структуры белков, предсказание взаимодействий различных белков друг с другом и другими молекулами, а также реконструкция процессов эволюции.

Биоинформатика помогает ученым, используя последовательности ДНК, прогнозировать структуры и возможные функции кодируемых ими белковых молекул, и таким образом, связывает геномные и протеомные проекты.

Велика роль биоинформатики в процессе маркировки генов и других объектов в последовательности ДНК.

Эволюционная биология исследует происхождение и появление видов, их развитие с течением времени. Методы биоинформатики активно используются биологами-эволюционистами для решения целого ряда задач:

- изучение эволюции большого числа организмов, включая эволюцию молекул ДНК, а не только строения или физиологии;
- сравнение целых геномов, что позволяет изучать такие явления, как дупликация генов, горизонтальный перенос генов и предсказывать бактериальные специализирующие факторы;
- построение компьютерных моделей популяций с целью предсказания поведения систем во времени.

Системная биология включает в себя целый ряд существующих и перспективных направлений в биологии. Системную биологию можно определить как междисциплинарную науку о жизни, изучающую сложные взаимодействия в живых системах и использующую новый подход в биологии: холизм вместо редуccionизма. Задачами системной биологии являются исследование и моделирование свойств сложных биологических систем, которые нельзя объяснить суммой составляющих ее свойств.

Для верификации создаваемых моделей системная биология работает с самыми различными типами экспериментальных данных, описывающих как отдельные составляющие, так и систему в целом. В системной биологии часто используются данные, полученные в других областях биологии: биохимии, биофизике, молекулярной биологии.

Биологические системы являются очень сложными объектами. Для их описания используется огромное количество параметров, переменных и уравнений, а значит, развитие современной системной биологии невозможно без использования компьютерных технологий.

Контрольные вопросы и задания

Заполните пропуски в следующих утверждениях:

1. С целью размножения (амплифицирования) и получения в чистом виде тех или иных генов, фрагменты эукариотической ДНК могут быть встроены в специально подготовленные бактериальные вирусы или плазмиды, называемые _____.

2. Отдельная колония бактерий, которая содержит плазмиду с включенным в нее фрагментом ДНК человека или другого живого организма, называется _____; набор таких бактерий, представляющий весь геном человека или другого живого организма, составит _____.

3. Считается, что мутации, не наследуемые согласно правилам Менделя, проявляют _____ и локализованы, по-видимому, в генах органелл.

4. В генах высших эукариот короткие сегменты кодирующей ДНК, которые называются _____, обычно разделены длинными последовательностями некодирующей ДНК, которые называются _____.

Глава 8. Молекулярная организация генома человека

8.1. Повторяющиеся и уникальные последовательности ДНК

Последовательности, однократно представленные в геноме, называются уникальными. Более половины генома человека представлено в разной степени повторяющимися последовательностями или повторами. Они могут быть более или менее равномерно распределены по геному (дисперсные повторы) или быть приуроченными к отдельным районам хромосом (консолидированные повторы). К числу последних относятся так называемые сателлиты – последовательности, которые при центрифугировании в градиенте плотности составляют отдельный пик (рис. 83). Их называли сателлитами (спутниками), потому что соответствующий им пик на графике сопутствует основному. У человека, как и у всех млекопитающих, сателлитная ДНК обогащена АТ-парами и имеет меньшую плавучую плотность по сравнению с тотальной ДНК. В прицентромерных районах всех хромосом человека присутствует альфа-сателлитная ДНК или альфоидная ДНК, имеющая длину повторяющейся единицы 171 п.н. Она является основным структурным компонентом центромеры и формирует прицентромерный гетерохроматин. Некоторые различия по нуклеотидной последовательности в разных хромосомах позволяют использовать альфоидную ДНК в качестве хромосомоспецифического зонда для FISH (например, при пренатальной диагностике на интерфазных клетках). Встречается индивидуальный полиморфизм числа повторов альфоидной ДНК, не имеющий фенотипического проявления. Бета-сателлитная ДНК, имеющая длину повторяющейся единицы 68 п.н., присутствует в центромерных районах HSA 1, 9, 13, 14, 15, 21, 22 и Y.

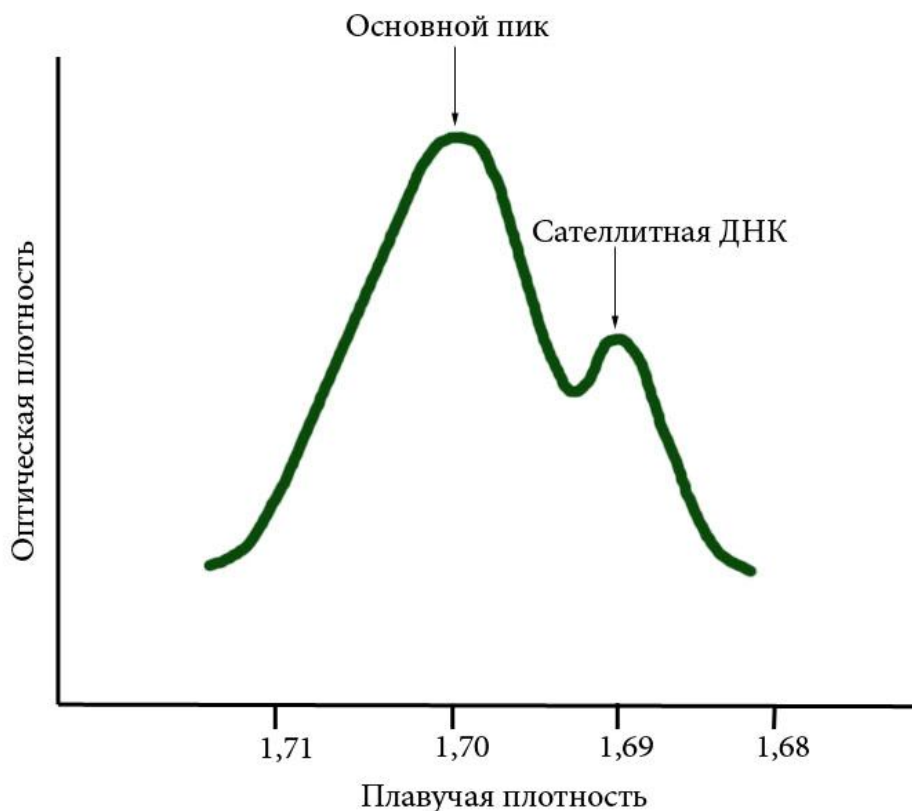


Рис. 83. Сателлитная ДНК

Сателлит 1 (длина повторяющейся единицы 25–48 п.н.) локализован в гетерохроматиновых районах большинства хромосом, сателлиты 2 (5 п.н.) и 3 (5 п.н.) могут быть выявлены практически во всех хромосомах.

Сателлиты представляют собой тандемные повторы (рис. 84) – повторяющиеся единицы следуют друг за другом и одинаково ориентированы. В инвертированных повторах единицы ориентированы в противоположных направлениях (рис. 85)



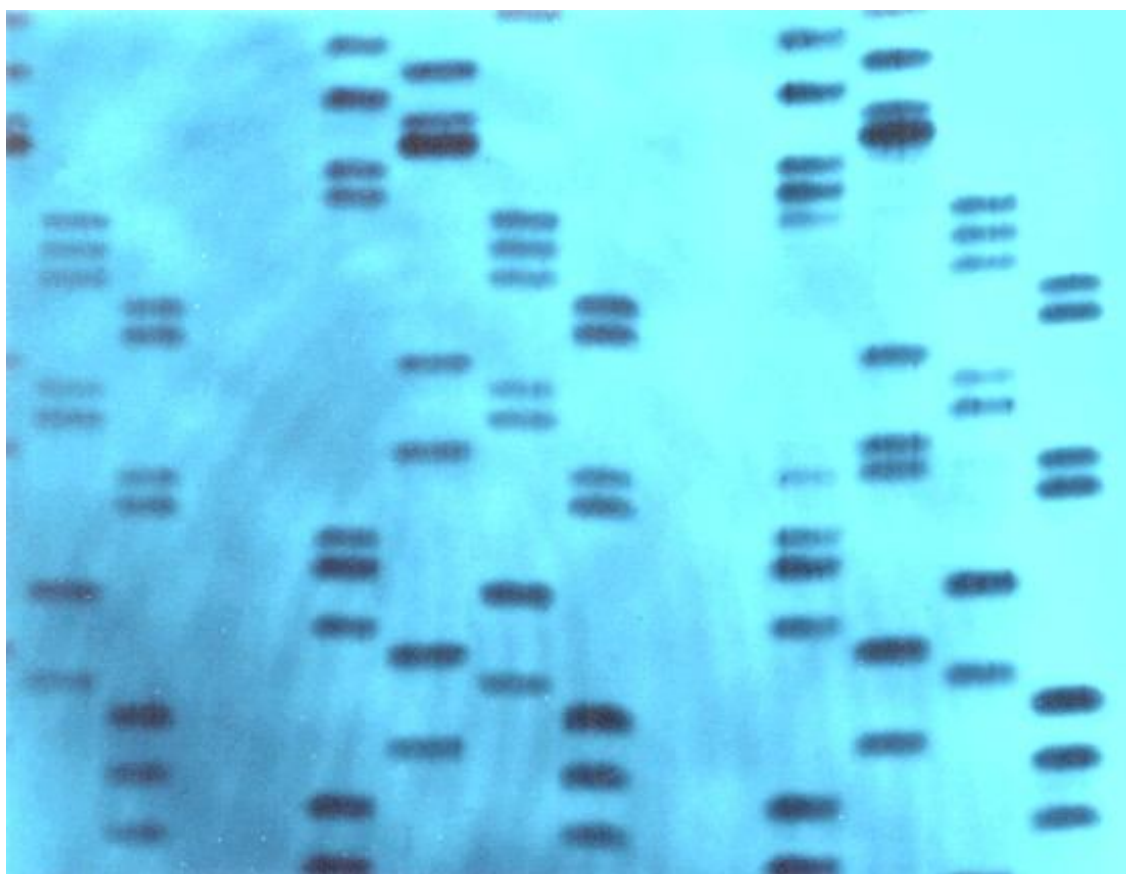
Рис. 84. Тандемный повтор



Рис. 85. Инвертированный повтор

Кроме классических сателлитов в геноме человека присутствуют мини- и микросателлиты.

Минисателлиты – тандемные повторяющиеся последовательности с единицей 10–60 п.н., имеющей центральный мотив ГГЦАГГА*Г. Они локализованы более чем в 1500 сайтах и отличаются значительной вариабельностью из-за часто происходящего неравного кроссинговера, что, собственно, характерно для всех тандемных повторов. При блот-гибридизации по Саузерну фрагментированной ДНК с минисателлитными зондами выявляется индивидуальный рисунок – геномный отпечаток, который может быть использован для идентификации личности и установления отцовства (рис. 86).



*Рис. 86. Пример геномного отпечатка.
(фото Science Photo Library)*

Микросателлиты – короткие tandemные повторы с длиной повторяющейся единицы 1–6 п.н. Отличаются значительным полиморфизмом и большим числом равномерно распределенных по геному локусов (около 100000). Эти обстоятельства сделали микросателлиты универсальными маркерами для генетического картирования, идентификации личности, установления родства. Поскольку микросателлиты имеют приемлемую для ПЦР-амплификации длину и с двух сторон фланкированы уникальной ДНК (где можно расположить индивидуальные праймеры), процедура определения аллелей таких полиморфных маркеров достаточно проста и поддается автоматизации (рис. 87). Используя разные флуорохромы, можно одновременно в одной пробирке анализировать полиморфизм сразу нескольких микросателлитных локусов. Анализ длин амплифицированных фрагментов обычно проводят при помощи капиллярного электрофореза с лазерным сканированием, что позволяет выявить различия до одного нуклеотида.

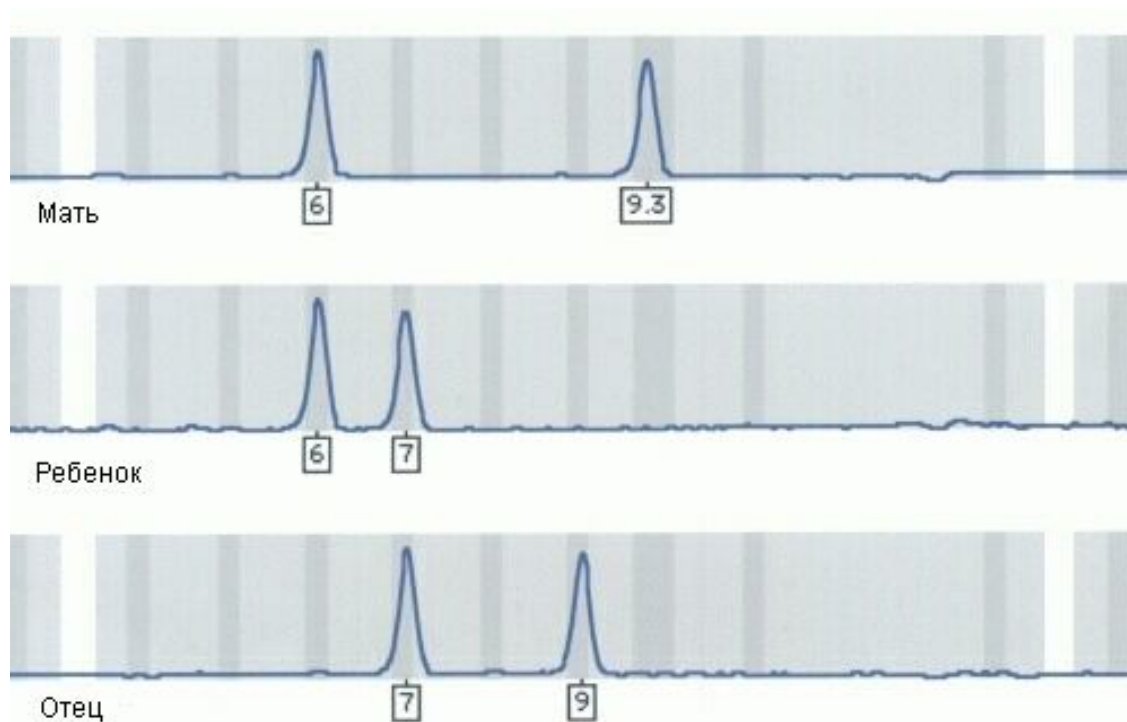


Рис. 87. Результаты анализа длин аллелей одного микросателлитного локуса в пределах семьи

К консолидированным повторам относят также гены рРНК, образующие кластеры (группы повторяющихся единиц) в районах вторичной перетяжки короткого плеча хромосом группы D (HSA 13–15) и группы G (HSA 21 и 22).

В отличие от консолидированных повторов дисперсные повторы расположены поодиночке, в разных участках генома. Одна и та же повторяющаяся единица может находиться в тысячах различных сайтов. К дисперсным повторам относят гены транспортной РНК (разд. 6.1), транспозоны (разд. 6.9) и псевдогены не содержащие интронов копии генов, как правило, возникшие путем обратной транскрипции.

Из числа транспозонов в геноме человека наиболее широко представлены длинные интерсперсные повторы (LINE) – 850000 копий и 21 % генома, короткие интерсперсные повторы (SINE) – 1500000 копий и 13 % генома, ретротранспозоны с длинными концевыми повторами (LTR) – 443000 копий и 8 % генома, и ДНК-транспозоны – 300000 копий и 3 % генома (разд. 6.9).

К группе LINE относят последовательности длиной около 5 т.п.н., которые содержат промотор, узнаваемый РНК-полимеразой II, ген обратной транскриптазы и иногда гены РНКазы Н. На 3'-конце находится сигнал полиаденилирования (ААТААА) и полиА-хвост. У человека имеется только одно семейство повторов LINE – L1.

Короткие интерсперсные повторы (SINE) представляют собой последовательности до 500 п.н. и содержат обратные транскрипты фрагментов тРНК, рРНК и мяРНК (разд. 6.1). У приматов, в том числе и у человека, значительная часть SINE представлена Alu-повторами, имеющими длину 280 п.н. и не содержащими генов.

На рис. 88 приведена схема классификации уникальных и повторяющихся последовательностей.

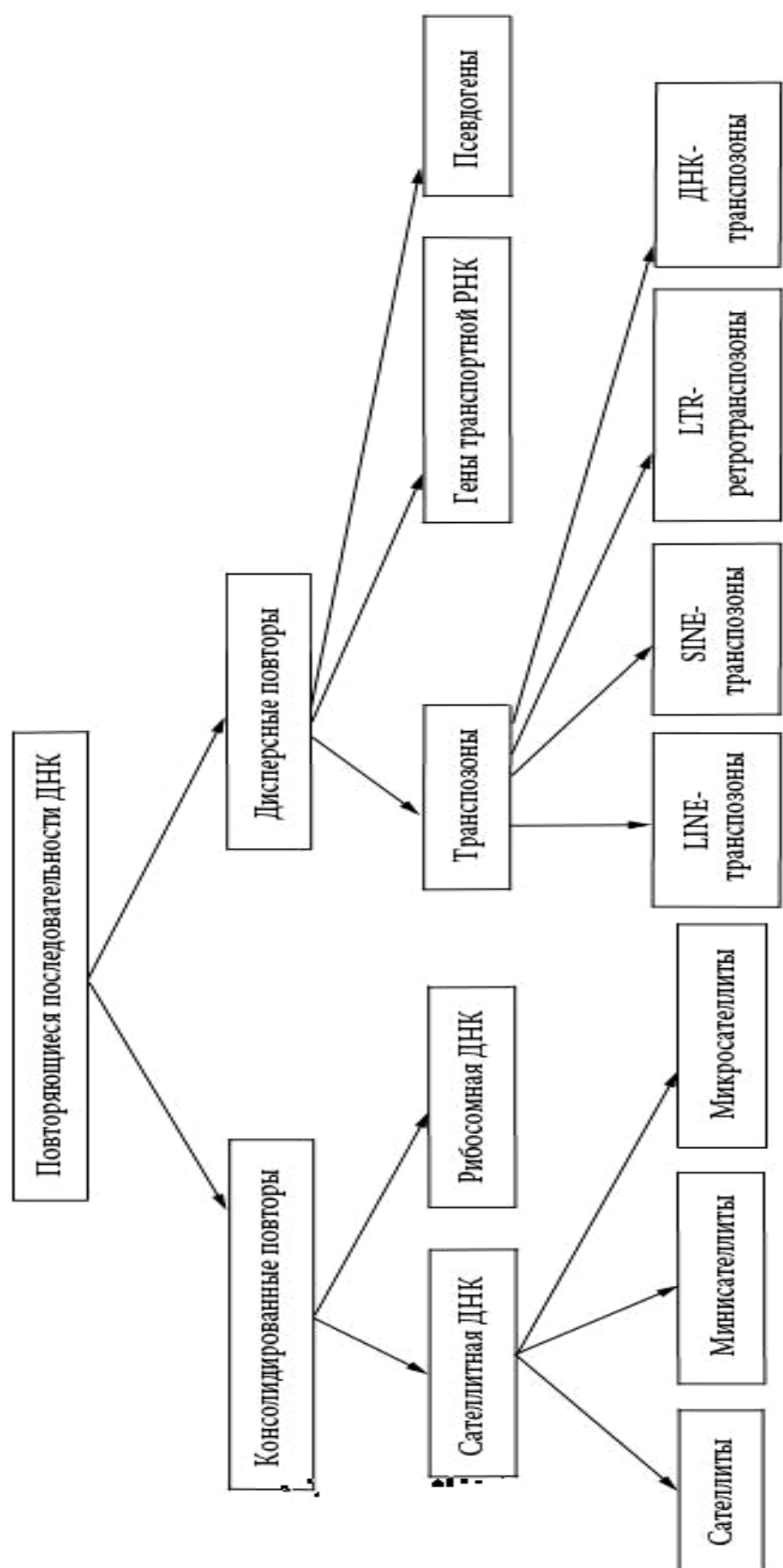


Рис. 88. Повторяющиеся последовательности генома человека

8.2. Композиционная гетерогенность

Неоднородность распределения по геному ГЦ- и АТ-обогащенных районов, другими словами, композиционная гетерогенность ДНК – одна из наиболее важных характеристик молекулярной организации геномов.

Более сорока лет назад Бернарди и сотрудники при исследовании генома мыши *Mus musculus* обнаружили, что комплекс ДНК и серебра может быть разделен с помощью равновесного центрифугирования в градиенте плотности Cs_2SO_4 по частоте сайтов на молекуле ДНК, связавших серебро. Это открытие позволило с высокой точностью разделять ДНК на фракции. Дальнейшее изучение этих фракций ДНК привело к открытию четкой композиционной гетерогенности ДНК. Композиционно гомогенные сегменты ДНК, принадлежащие к небольшому числу семейств, различающихся по плавучей плотности, были названы изохорами. Фракционирование ДНК по плавучей плотности при центрифугировании фрагментов ДНК в градиенте Cs_2SO_4 (или сахарозы) было выявлено у большого числа видов животных. Это отражает гетерогенность ДНК по нуклеотидному составу: АТ-богатые последовательности обладают большей плавучей плотностью, чем ГЦ-богатые. Относительные количества ДНК в семействах изохор формируют так называемый композиционный изохорный паттерн генома (также он называется геномным фенотипом), т. е. характерный «рисунок» из изохор, являющийся специфичным для каждого отряда или семейства.

У человека были выявлены два «легких» семейства изохор: L1 (1,698 г/см³) и L2 (1,700 г/см³), и три «тяжелых»: H1 (1,704 г/см³), H2 (1,708 г/см³) и H3 (1,712 г/см³). У человека семейства L1 и L2 составляют свыше 62 % всего генома; H1 – 22 %, H2 – 9 %, семейство H3 составляет около 3 % генома.

Наибольшее значение с точки зрения структурно-функциональной организации генома имеет вопрос о связи различных семейств изохор с кодирующими последовательностями ДНК и особенностями их экспрессии. В первых исследованиях этого вопроса было показано, что большинство из 40 взятых в анализ генов человека расположены в ГЦ-богатых семействах. Впоследствии локализация *in silico* (путем компью-

терного анализа) более 14000 генов человека привела авторов к тому же самому выводу, позднее подтвержденному на еще больших выборках кодирующих последовательностей. На рис. 89 представлена диаграмма, демонстрирующая распределение плотности генов в каждом из семейств изохор у человека.

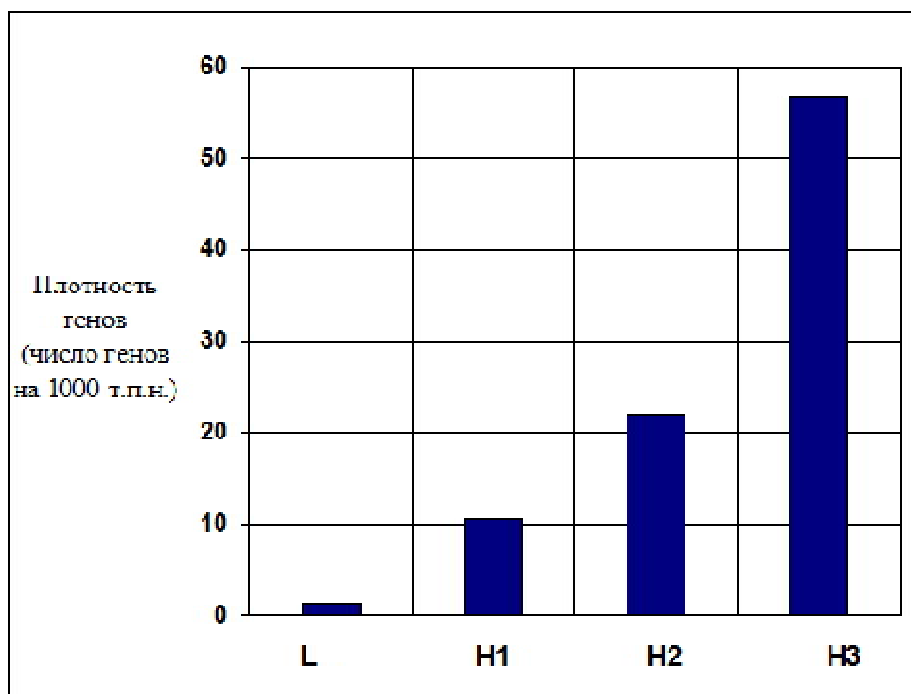


Рис. 89. Плотность генов в различных семействах изохор у человека

Выявление связи временных и межтканевых различий уровня экспрессии генов с ГЦ-уровнем, иными словами, распределения тканеспецифических генов и генов домашнего хозяйства относительно изохор, является не менее важным аспектом характеристики функционального значения композиционной гетерогенности геномной ДНК. Обобщая данные по структуре хроматина и распределению генов и изохор, Дж. Бернарди в 1993 г. писал: «Скорее всего, наибольший уровень транскрипции встречается в семействе изохор H3, поскольку там концентрация генов, прежде всего генов домашнего хозяйства, является наибольшей». Гипотеза о высокой транскрипционной активности генов, локализованных в семействе H3, подтверждалась и исследованиями нуклеотидного контекста стартовых АУГ-кодонов. Привлечение дополнительного критерия – процентного содержания гуанина или цитозина в третьем положении кодона (ГЦ3-уровень) – помимо молярного отноше-

ния ГЦ и АТ (ГЦ-уровень), и статистический анализ последовательностей ДНК из геномных баз данных человека и шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis*) позволили установить, что гены домашнего хозяйства:

1) преимущественно локализованы в ГЦ-богатых семействах изохор;

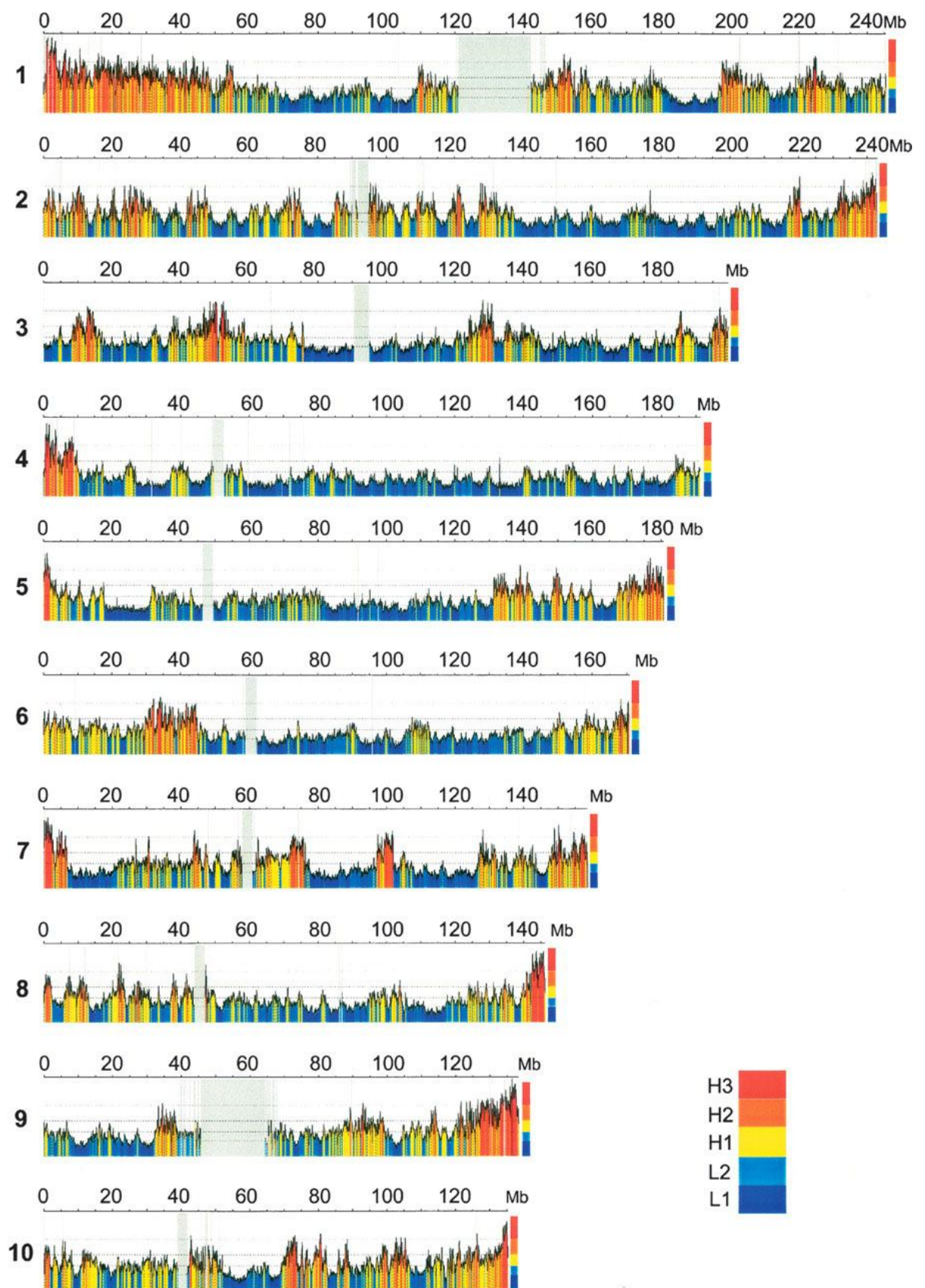
2) не составляют большинства генов в ГЦ-богатых семействах изохор;

3) являются не менее ГЦ₃-обогащенными, чем тканеспецифические гены.

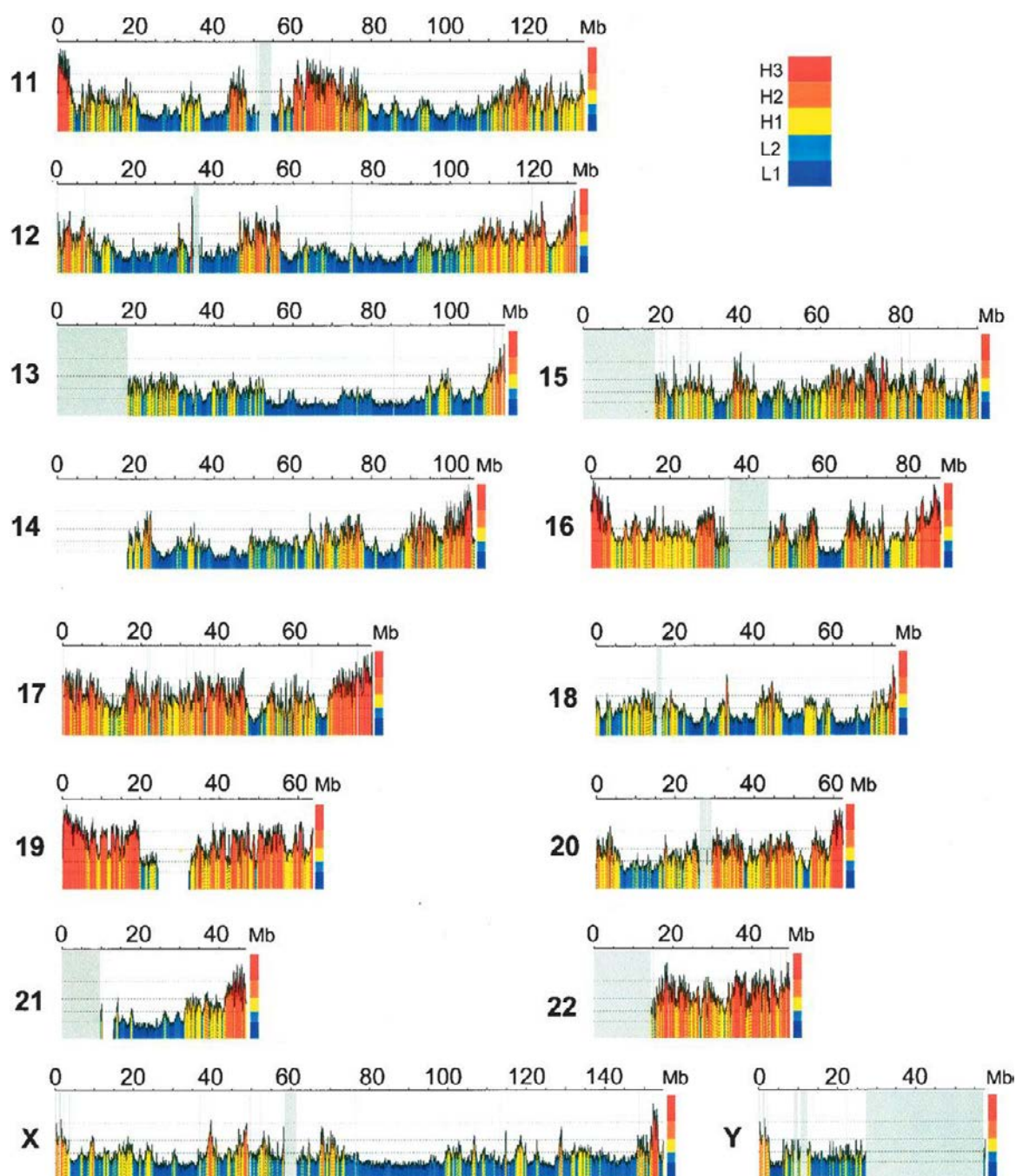
Повышенное содержание кодирующих последовательностей, более высокий уровень рекомбинации, большое число ГЦ-обогащенных коротких интерсперсных повторов (SINE) в тяжелых изохорах, в то время как в легких локализовано значительно меньше генов, ниже уровень рекомбинации и находятся почти исключительно ГЦ-обедненные длинные интерсперсные повторы (LINE), дает основание говорить об изохорах как структурно-функциональных единицах организации генома. Границы между тяжелыми и легкими изохорами на примере детально исследованного в отношении композиционного состава на молекулярном уровне кластера генов гистосовместимости (МНС) человека являются более чем композиционными структурами – временные границы репликации в фазе S клеточного цикла практически точно соответствуют физическим границам локализации изохор.

Композиционное картирование – это изучение распределения по длине хромосом различных семейств изохор. Особый интерес представляет соотнесение композиционных и цитогенетических карт хромосом, выявление приуроченности фракций изохор к морфологическим (центромера, теломера) и цитохимическим (G/R-блоки) маркерам. Различают «хромосомное» композиционное картирование (методом гибридизации *in situ* различных фракций изохор на хромосомах в присутствии конкурирующей ДНК, которая позволяет почти полностью исключить неспецифическую гибридизацию повторов) и «молекулярное» – путем локализации генов во фракциях изохор методом ПЦР или блот-гибридизации по Саузерну.

У млекопитающих было показано неоднородное распределение разных семейств изохор. Самые «тяжелые» изохоры H3 расположены в Т-дисках (преимущественно прителомерные R-диски, с наиболее ярко выраженными структурно-функциональными характеристиками этой группы), которые характеризуются наибольшей концентрацией генов, особенно генов домашнего хозяйства и онкогенов. Наблюдается общая тенденция приуроченности легких фракций к G-дискам (относительно инертные, позднепликотирующие, выявляемые при окрашивании красителем Гимзы), где значительно ниже концентрация генов, чем в R-дисках (обратные G-дискам, ранеплицирующие, относительно функционально активные), и расположены преимущественно тканеспецифические гены, а тяжелых изохор – к R-дискам. Так, у человека Т-диски представлены самым тяжелым семейством изохор H3 и частично семействами H2 и H1, R'-диски (R-диски за исключением из их числа Т-дисков) – семейством H1 с минорным участием семейств H2 и H3 и семействами легких изохор L1 и L2, а G-диски – семействами L1 и L2 с минорным компонентом H1. У домового мыши мажорным компонентом Т-дисков являются изохоры семейства H2, R'-диски представлены преимущественно изохорами семейства H1 с незначительным участием L1 и L2, а G-диски – почти исключительно семействами легких изохор L1 и L2. В интерфазных ядрах было показано полярное относительно друг друга расположение наиболее легких и наиболее тяжелых фракций изохор, что, по всей видимости, отражает близость наиболее ГЦ-богатых теломерных районов интерфазных хромосом. На рис. 90 показано распределение изохор по длине хромосом человека. Тонкое физическое картирование изохор на прометафазных хромосомах человека позволило построить композиционные карты высокого разрешения, совмещенные с картами контигов протяженных геномных клонов. Такие карты представлены в сети Интернет (<http://bioinfo2.ugr.es/isochores>), что дает возможность быстро получить композиционную характеристику любого изучаемого района или фланкирующей области любой последовательности генома человека.



A.



Б.

Рис. 90. Распределение изохор по длине хромосом человека*

* См.: Genome Researches. 2006. V. 16. P. 536–541.

8.3. Ортология и паралогия

Полагают, что в ходе ранней эволюции часто происходили дубликации генов, что привело к быстрой дивергенции и специализации ферментативных реакций, определивших разнообразие жизненных форм на Земле. Увеличение размеров геномов, возникновение новых ферментативных реакций, формирование цитоскелета, появление комплексных путей метаболизма считают прямыми следствиями генной дубликации.

Понятие «гомология» применяют по отношению к двум структурам или последовательностям (нуклеотидным или аминокислотным), которые развились из одной предковой структуры или последовательности. Чтобы классифицировать различные типы гомологии, принято использовать термины «ортология» и «паралогия». Ортологическими называются структуры или последовательности двух различных организмов, которые произошли из одной предковой структуры или последовательности, совсем не обязательно сохраняя функции их предшественника. Поскольку проследить эволюцию структур или последовательностей на практике не всегда представляется возможным, обычно эволюционный консерватизм структур или последовательностей служит основанием для того, чтобы считать их ортологическими. Пример ортологии – β -цепи глобина человека и домового мыши. Понятие «паралогия» относится к структурам или последовательностям, возникшим в результате дубликации. Обычно это понятие применяют к гомологичным структурам или последовательностям в пределах одного генома. Например, β -цепь глобина человека является паралогом α -цепи глобина и миоглобина человека, поскольку они все произошли в результате последовательных дубликаций. Для серий паралогичных районов, которые могут считаться происшедшими от одного предкового района, предложен термин «паралогон». Копаралогами называются гены, принадлежащие к одному паралогону, независимо от того, являются ли они между собой паралогами или нет. Общий предок районов, входящих в один паралогон, называется «протопаралогон».

Два раунда крупномасштабных дупликаций произошли в ходе ранней эволюции позвоночных животных согласно так называемой гипотезе 2R (другое название – модель «один-к-четырем»). Следовательно, каждый ген должен быть представлен четырьмя гомологичными последовательностями в каждом геноме. Процессы дивергенции и специализации могли существенно изменить структурные и функциональные характеристики гомологов, а дупликации и делеции – их число. Наличие большого числа паралогичных нуклеотидных последовательностей, представленных двумя или тремя генами, свидетельствует о возможной массовой потере генов после двух раундов дупликации в соответствии с вышеизложенной гипотезой. Локализация в паралогонах и сходство последовательностей двух или нескольких молекул ДНК может служить основанием для поиска их общего предшественника, как это показано на примере генов семейства WNT (гомологов wingless-type генов дрозофилы) человека.

Вопрос о том, насколько физическая кластеризация (локализация в одном хромосомном районе) отражает функциональную кластеризацию нуклеотидных последовательностей и, следовательно, возможна ли коэволюция функционально-специализированных районов хромосом, обсуждается в течение последних десяти лет. Активация отдельных районов хромосом в определенных клеточных линиях может быть объяснением природы паралогичных районов. Например, гены ацетилхолинэстеразы и тироглобулина имеют гомологию нуклеотидных последовательностей и расположены вблизи от генов нейропептида Y (HSA 7) и панкреатического полипептида Y (HSA 17) соответственно. Таким образом, два гена из паралогичного района хромосомы 7 экспрессируются в клетках нервной системы, а два гена соответствующего района хромосомы 17 – в клетках иммунной системы. Анализ распределения генов, кодирующих белки, вовлеченные в различные функциональные комплексы, по длине хромосом человека позволил установить соответствие некоторых паралогионов блокам генов,

вовлеченных в один каскад реакций. Таким образом, паралогия может быть связана с функциональной специализацией отдельных районов хромосом. С другой стороны, могут присутствовать механизмы, обеспечивающие дифференциальную экспрессию паралогинов в различных клеточных линиях. Данные сравнительного изучения паралогических районов хромосом человека и дрозофилы послужили основанием для гипотезы коэволюции функциональных кластеров.

Гены нескольких семейств (плазминогенные активаторы, анкирины, рецепторы ростовых факторов фибробластов, адренергические рецепторы, везикулярные моноамин-транспортеры, липопротейн липазы), представленные в четырех районах хромосом человека – HSA 4p16, HSA 5q33-q35, HSA 8p12-p21, HSA 10q24-q26 – оказались представлены в геномах позвоночных, включая костистых рыб, в виде консервативных паралогинов. В то же время у иглокожих, насекомых и нематод указанные семейства представлены одним геном. Интересно, что у плодовой мушки *Drosophila melanogaster* и нематоды (круглого червя) *Caenorhabditis elegans* гомологи генов этих семейств сцеплены. Предполагают, что протопаралогон существует со времени происхождения многоклеточных животных. На примере гомеозисных генов семейства HOX и инсулиноподобных белков показано, что скорее всего тетраплоидизация имела место на рубеже цефалохордовые – черепные.

В настоящее время известно 15 паралогинов человека (серий паралогических районов, имеющих происхождение от одного предкового района) (рис. 91), которые включают более 1700 генов, что составляет около 5 % от общего числа генов человека. Большинство генов, входящих в паралогины, представляют обширные семейства, такие как иммуноглобулины, ольфакторные рецепторы, антигены гистосовместимости и т. д.

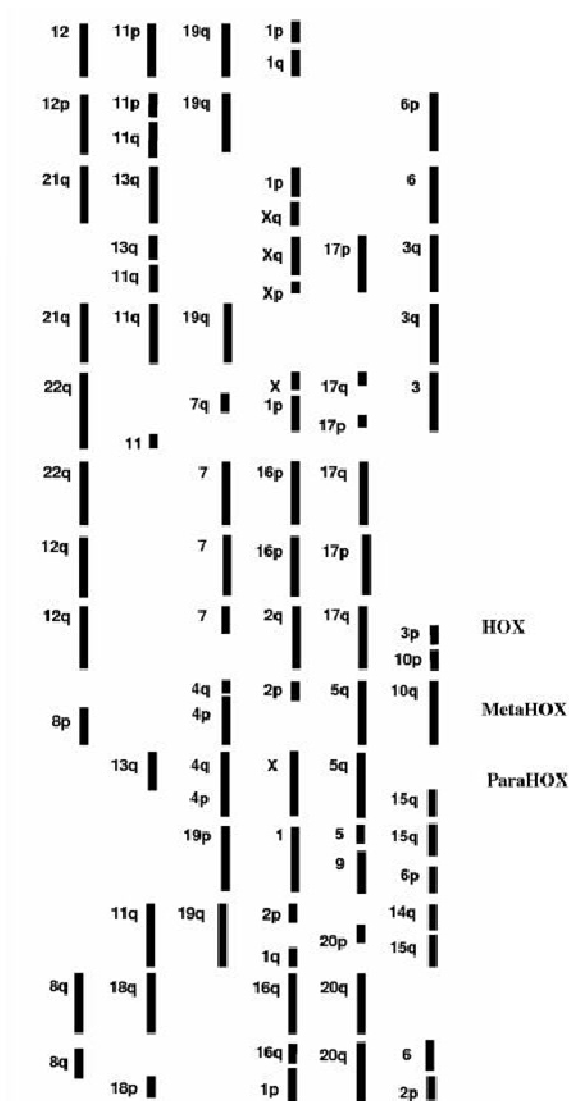


Рис. 91. Обобщенная карта паралогинов человека.

Обращает на себя внимание тот факт, что районы хромосом расположены по четыре – в соответствии с 2R-гипотезой*

На основании паралолии картирование генома может проводиться быстрее – зная локализацию одного представителя семейства генов и паралогию этого хромосомного района другим районам, можно предсказать три наиболее вероятных сайта локализации другого представителя того же генного семейства. Зная локализацию двух или трех генов семейства, можно предсказать соответственно два или один возможный район локализации.

* См.: FEBS Letters, 2001, V. 491, P. 237–242.

Наряду с традиционными морфологическими подходами к изучению эволюционных отношений и механизмов данные сравнительного картирования хромосом позволяют делать выводы о путях эволюции. В этом случае участки хромосом разных организмов можно рассматривать как морфологические структуры, которые могут проявлять отношения гомологии и аналогии между собой. Быстрый прогресс геномного картирования, преимущественно на различных видах млекопитающих, позволил применить указанный подход и выявить неожиданно высокий уровень эволюционного консерватизма хромосомных районов. Среди животных наиболее подробно феномены ортологии изучены в геномах человека и домового мыши. Выявлено 202 района ортологии, которые включают более 1800 кодирующих последовательностей*. Наиболее детальная информация об эволюционном консерватизме хромосомных районов может быть получена при сравнении полностью секвенированных геномов или хромосом различных видов. В этом случае становится возможным выявление точек разрыва ортологии хромосомных районов с точностью до нуклеотида. Сравнение полной нуклеотидной последовательности хромосомы 16 домового мыши (хромосомы мыши *Mus musculus* обозначают MMU, например, MMU 16) и генома человека позволило охарактеризовать на молекулярном уровне эволюционный консерватизм MMU 16 и HSA 3, HSA 8, HSA 12, HSA 16, HSA 21, HSA 22. Хромосома 16 была выбрана для сравнения, поскольку было известно, что есть протяженный участок ее гомологии (около 25 млн пар оснований) с хорошо охарактеризованной хромосомой 21 человека. В отношении кодирующих последовательностей ДНК с неизвестной функцией (ESTs) принят критерий ортологичности – более 80 % гомологии нуклеотидной последовательности на протяжении более 100 пар оснований. В данной работе показан эволюционный консерватизм локализации 11 822 кодирующих последовательностей со средним значением идентичности нуклеотидной последовательности 88,1 % и средней длиной ортологичных генов 198 пар оснований. В среднем на каждые 8 тыс. пар нуклеотидов приходился один консервативный маркер.

* URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/Homology>

Эволюционный консерватизм состава кодирующих последовательностей в ортологичных районах может быть выявлен при помощи стандартных методов физического картирования. Сравнение между собой крупномасштабных последовательностей различных геномов позволяет установить наличие консерватизма порядка расположения генов по отношению друг к другу на участках, трудноразрешимых для обычных методов. В случае когда три последовательности в пределах короткого интервала на хромосоме расположены в том же порядке, что и гомологичные им последовательности на хромосоме другого вида, это их отношение определяется как «консерватизм синтении». Оказалось, что блоки консервативной синтении человека и домового мыши могут включать от нескольких до нескольких сот генов, причем отмечается в среднем больший физический размер синтенных блоков человека. Суммарная длина синтенных блоков на MMU – 16–92 млн пар оснований, а в ортологичных ей районах хромосом человека – 108 млн пар оснований.

Помимо, безусловно, большого значения для теоретической биологии феномен ортологии оказался очень полезен для картирования геномов, поскольку, основываясь на консерватизме изучаемых районов, можно экстраполировать данные по картированию генома более изученного в этом отношении вида на менее изученный. Поскольку в настоящее время наиболее изученным видом является человек, выявление ортологии нуклеотидных последовательностей и хромосомных районов любого вида позвоночных животных и человека имеет особое значение.

8.4. Геномные базы данных

Геномные базы данных представляют собой электронные библиотеки и служат для обобщения и хранения информации о генах, геномах, генотипах, фенотипах и любых данных, имеющих отношение к наследственности. Как правило, доступ к ним неограничен. С любого компьютера, подключенного к сети Интернет, можно проводить поиск информации как исходя из названия гена или мутации, так и из фенотипического признака (например, наследственного заболевания).

Наиболее полная и упорядоченная информация по геному человека хранится на портале NCBI – www.ncbi.nlm.nih.gov, который поддерживается сотрудниками Национальных институтов здоровья США (National Institutes of Health).

Поиск по фенотипам обычно начинают с базы данных OMIM (www.ncbi.nlm.nih.gov/omim), интерфейс которой показан на рис. 92. Название фенотипического признака позволяет получить сведения о различных генах, связанных с его проявлением, их локализации на хромосомах, известных мутациях. Справа находится гиперссылка на связанные ресурсы – можно получить нуклеотидную и аминокислотную последовательности, узнать в каких тканях и на каких стадиях происходит экспрессия, есть ли альтернативный сплайсинг, существуют ли коммерческие средства диагностики. Также можно узнать названия и адреса лабораторий, где проводят молекулярные тесты для данного фенотипа.



Рис. 92. Интерфейс базы данных OMIM

База данных PubMed (рис. 93) содержит названия, сведения об авторах и резюме наиболее значимых научных публикаций по биологии и медицине. Поиск проводится по ключевым словам, фамилиям авторов и выходным данным публикации.



Рис. 93. Интерфейс базы данных PubMed

Если требуется собрать все сведения об имеющейся нуклеотидной последовательности, можно воспользоваться системой поиска BLAST (рис. 94). Параметры поиска можно варьировать исходя из целей исследования. Все последовательности, имеющие гомологию с изучаемой, принципиально могут быть обнаружены таким образом. Гиперссылки в правом верхнем углу позволяют получить информацию о хромосомной локализации, экспрессии, процессинге генов, имеющих гомологию с исходной последовательностью.

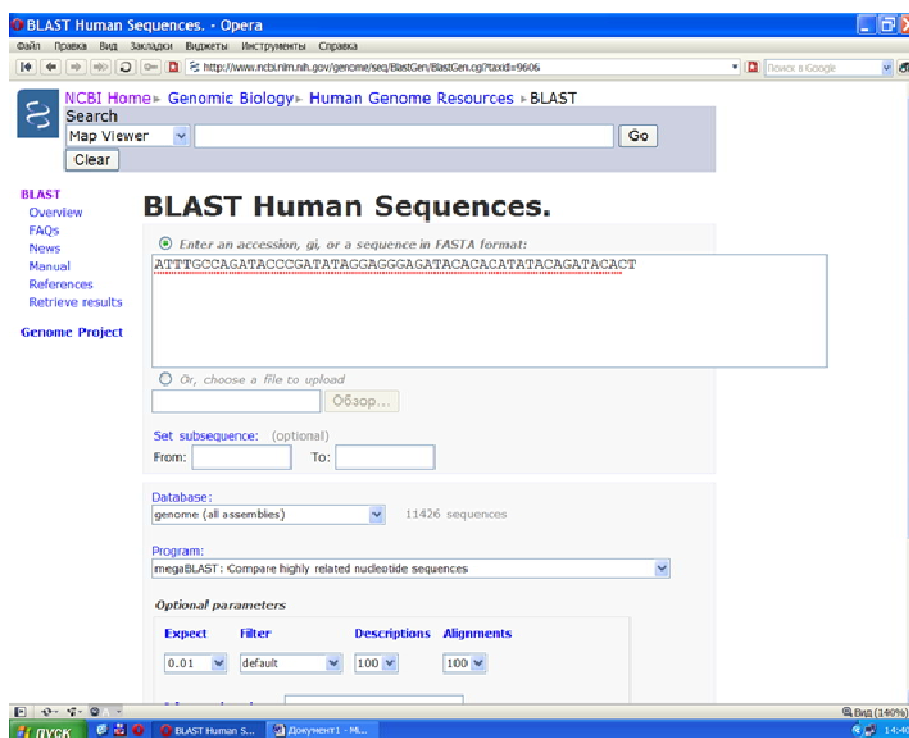


Рис. 94. Интерфейс поисковой системы BLAST

Карты хромосом с возможностью поиска по названию или символу маркера, а также по отдельным хромосомным районам, находятся в разделе MapViewer (www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview) (рис. 95).

Кроме того, существует большое количество специализированных баз данных по отдельным генам или заболеваниям, а также частотам встречаемости различных патогенных аллелей в разных популяциях человека. К сожалению, российские популяции в них представлены скудно (как правило, есть данные только по Центральной России). Учитывая возрастающую мобильность населения и наличие большого числа в крупных городах нашей страны выходцев из Кавказа и Средней Азии (где этническое разнообразие велико, а генотипическая структура популяций не изучена), при создании отечественного диагностического программного обеспечения следует использовать все известные в мире аллели, связанные с наследственными заболеваниями и предрасположенностями.

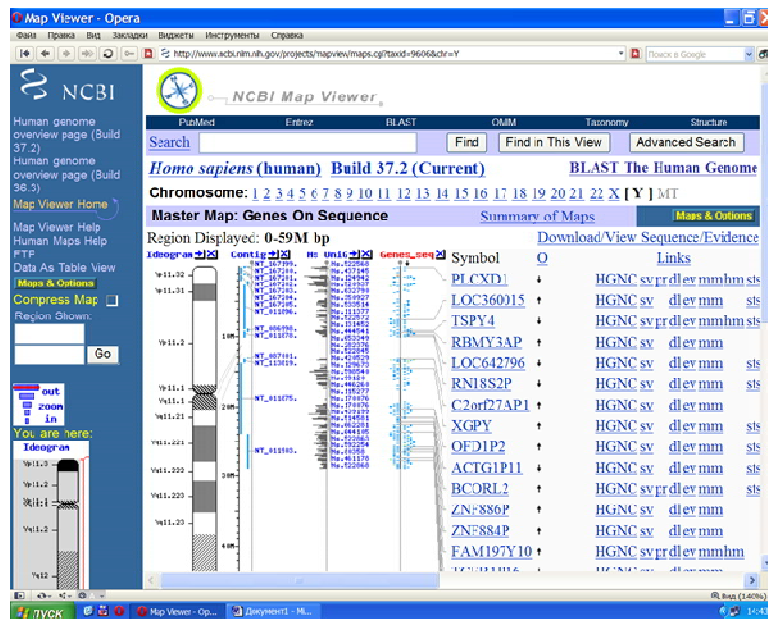


Рис. 95. Интерфейс системы MapViewer

Контрольные вопросы и задания

- Микросателлиты относятся к группе:
 - дисперсных повторов;
 - консолидированных повторов;
 - транспозонов.
- На рис. 96 представлены данные геномного фингерпринтинга. Определите родственных индивидуумов.

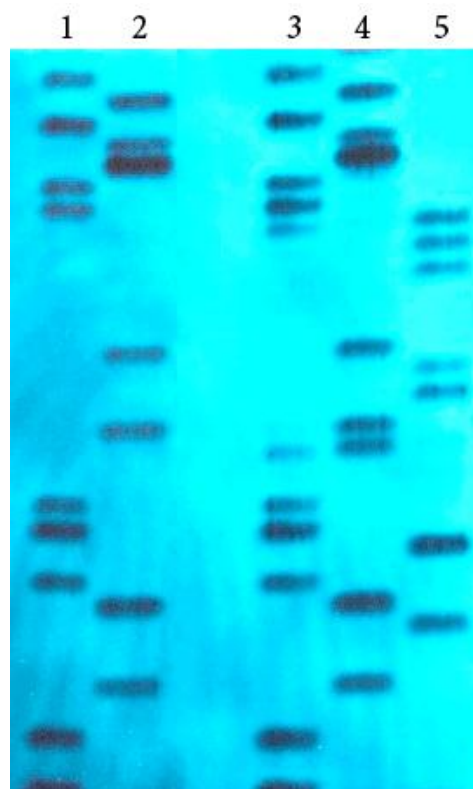


Рис. 96. Данные геномного фингерпринтинга (для задачи 2 к гл. 8)

3. Формальный отец ребенка сомневается в своем биологическом отцовстве. Справедливы ли его опасения по данным микросателлитного анализа, приведенным на рис. 97?

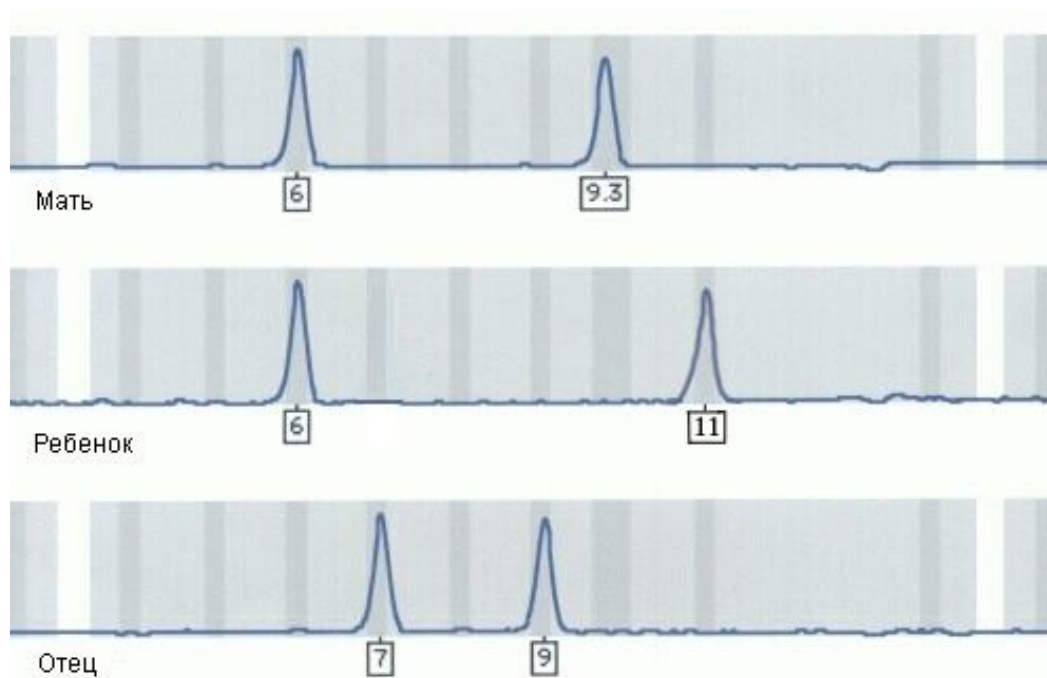


Рис. 97. Данные микросателлитного анализа для задачи 3 к гл. 8

4. Поиск по нуклеотидным последовательностям лучше проводить в системе:

- А) BLAST;
- Б) OMIM;
- В) PubMed.

Глава 9. Наследственные болезни человека

9.1. Понятие, классификация и особенности наследственной патологии

Патология – это любое отклонение от нормального течения биологических процессов – обмена веществ, роста, развития, размножения.

Наследственная патология – отклонение от нормы с установленным фактом наследования, т. е. передачи от поколения к поколению. Следует различать врожденную патологию – присутствующую от рождения индивидуума – от наследственной патологии. Врожденная патология может быть обусловлена действием факторов внешней среды – недостатком питательных веществ и кислорода во время внутриутробного развития, родовыми травмами, инфекциями и т. д. Установление в соответствии с требованиями генетического анализа факта наследования аномального признака является единственным основанием признания наследственного характера патологии.

Существует два типа классификации наследственной патологии. Первый (принятый преимущественно в отечественной литературе) – *клинический* тип. Согласно этому типу классификации существует четыре группы заболеваний:

- группа I – это собственно наследственные болезни: хромосомные и генные заболевания (синдромы Эдвардса и Патау, фенилкетонурия, муковисцидоз);
- группа II – болезни с выраженной наследственной предрасположенностью, в патогенезе которых проявление наследственных факторов определяется действием специфических внешних обстоятельств (артериальная гипертензия, сахарный диабет, подагра);
- группа III – заболевания, которые определяются преимущественно факторами внешней среды, но в патогенезе которых некоторую роль играют наследственные факторы (глаукома, атеросклероз, рак молочной железы);

- группа IV – болезни, к которым наследственность, на первый взгляд, не имеет отношения (пищевые отравления, переломы, ожоги).

Следует отметить, что часто используемые понятия «семейные» и «спорадические» заболевания не имеют прямого отношения к наследственности. Семейные заболевания наблюдаются у родственников, но могут быть вызваны и действием одинаковых внешних причин, например, характером питания. Спорадические случаи наблюдаются у отдельных индивидуумов, но могут быть обусловлены и редким сочетанием аллелей или возникшей *de novo* мутацией.

Вторая система классификации – *генетическая* – является общепринятой в зарубежной литературе и в последнее время находит все более частое применение и в литературе на русском языке. Согласно этой системе выделяют пять групп:

- группа I – генные болезни, определяемые мутациями в определенных генах. Это преимущественно моногенные признаки с аутосомно-доминантным, аутосомно-рецессивным, сцепленным с полом доминантным, сцепленным с полом рецессивным, голландрическим и митохондриальным типом наследования (разд. 2.3; 2.4);

- группа II – хромосомные болезни, т. е. геномные и хромосомные мутации (разд. 5.8; 5.9);

- группа III – болезни с наследственной предрасположенностью, в патогенезе которых играют роль средовые и наследственные факторы, имеющие моногенный или полигенный тип наследования (миопия, патологическое ожирение, язва желудка);

- группа IV – генетические болезни соматических клеток, зачастую связанные со злокачественными новообразованиями (ретинобластома, опухоль Вильмса, некоторые формы лейкемии);

- группа V – болезни генетической несовместимости матери и плода, которые развиваются в результате иммунной реакции матери на антигены плода (несовместимость по резус-фактору и некоторым другим эритроцитарным системам антиген-антитело).

Наследственные заболевания могут начать свое проявление в разном возрасте. Характер манифестации (времени проявления первых симптомов болезни) является специфическим для разных форм наследственной патологии. Как правило, для наследственных заболеваний характерно хроническое (продолжительное) прогрессирующее (с нарастанием степени выраженности симптомов) течение.

9.2. Хромосомные болезни

К этой группе относят заболевания, вызванные аномалиями числа или структуры хромосом. Около 1 % новорожденных имеют аномальный кариотип, а среди мертворожденных встречаемость аберраций числа или структуры хромосом – 20 %. Общими характерными чертами хромосомных болезней являются: низкий вес при рождении, задержка развития, низкий рост, микроцефалия, микрогнатия, нарушения остеогенеза, аномальное расположение глаз. Более подробное описание хромосомных болезней приведено в разд. 5.8 и 5.9.

9.3. Генные болезни

Генными болезнями называют патологические состояния, причиной которых являются генные мутации. Чаще всего это понятие применяют к моногенным заболеваниям.

Для этой группы характерна гетерогенность – одинаковые заболевания могут быть вызваны мутациями в разных генах. Общими принципами развития патологии на уровне генов могут быть следующие:

- выработка аномального белкового продукта;
- отсутствие нормального белка;
- недостаточное количество нормального белка;
- избыток нормального белкового продукта.

По характеру нарушений гомеостаза (постоянства внутренней среды организма) выделяют следующие группы генных болезней:

Болезни аминокислотного обмена

Самая многочисленная группа наследственных болезней обмена веществ. Почти все они наследуются по аутосомно-рецессивному типу. Причина заболеваний – недостаточность того или иного фермента, ответственного за синтез аминокислот.

Фенилкетонурия – нарушение превращения фенилаланина в тирозин из-за резкого снижения активности фенилаланингидроксилазы – аутосомно-рецессивное заболевание. Проявляется в возрасте 2–4 месяцев, первые симптомы – вялость, судороги, экзема, «мышинный» запах (запах кетонов). Постепенно развиваются тяжелые поражения головного мозга, приводящие к резкому снижению интеллекта вплоть до идиотии. Если с первых дней жизни полностью исключить (или существенно ограничить количество) фенилаланин из рациона больного ребенка до полового созревания, симптомы не развиваются. Болезнь обусловлена мутациями в гене *PAH*, который кодирует фенилаланин-4-гидроксилазу. Ген *PAH* локализован в HSA12q24.1. Описано несколько десятков мутаций этого гена в разных популяциях. Существуют диагностические системы на основе ПЦР, которые позволяют выявлять гетерозиготное носительство. В последнее время разрабатываются новые подходы к лечению фенилкетонурии: заместительная терапия фенилаланинлиазой – растительным ферментом, который катализирует расщепление фенилаланина на безвредные метаболиты, и генная терапия путем встраивания в геном нормального гена фенилаланингидроксилазы.

Алкаптонурия – аутосомно-рецессивное нарушение обмена тирозина и накопления в тканях организма (суставные хрящи, сухожилия) гомогентизиновой кислоты. Манифестация происходит в детском возрасте. Первый симптом – потемнение мочи. Часто развивается мочекаменная болезнь и пиелонефрит. Накопление продуктов распада гомогентизиновой кислоты приводит к поражению суставов (в первую очередь коленных и тазобедренных). Отмечается потемнение и повышенная хрупкость соединительной ткани. Характерно потемнение склер и ушных раковин. Мутации в гене *HGD* – оксидазы гомогентизиновой кислоты – являются причиной этого заболевания. Этот ген содержит 14 экзонов и локализован в HSA3q21-23. Описано около 100 различных миссенс-мутаций, мутаций типа сдвига рамки считывания и изменения сайта сплайсинга, которые связаны с этим заболеванием.

Глазо-кожный альбинизм первого типа – отсутствие или существенный недостаток пигмента кожи, волос, радужной и пигментной оболочек глаза (рис. 98).



Рис. 98. Представитель негроидной расы – альбинос*

Заболевание с аутосомно-рецессивным типом наследования. Проявляется в различной степени депигментации кожи, волос, радужной и пигментной оболочек глаза, снижением остроты зрения, светобоязни, нистагме, частых солнечных ожогах. Различные миссенс-мутации, мутации типа сдвига рамки считывания и нонсенс мутации в гене тирозиназы (*TYR*, HSA11q24) ответственны за это заболевание.

* URL: http://upload.wikimedia.org/wikipediacommons/99a/Albinisitic_man_portrait

Нарушения обмена углеводов

Галактоземия – отсутствие или существенное снижение активности фермента галактозо-1-фосфат-уридилтрансферазы и накопление в крови галактозы и ее производных, которые оказывают токсическое действие на центральную нервную систему, печень и хрусталик глаза. В первые дни и недели жизни наблюдаются желтуха, увеличение печени, нистагм, гипотония мышц, рвота. Со временем развивается катаракта, отставание в физическом и умственном развитии. Характерна непереносимость молока.

Болезнь имеет аутосомно-рецессивный тип наследования. Несколько форм этого заболевания обусловлены различными мутантными аллелями гена *GALT* (галактозо-1-фосфатуридилтрансферазы), локализованного в районе HSA9p13. Миссенс-мутации в разной степени снижают активность фермента, что определяет разную степень выраженности симптомов заболевания. Например, галактоземия Дурте протекает почти бессимптомно, отмечается только склонность к расстройствам печени.

Болезнь Гирке (гликогеноз I типа, гликогеновая болезнь I типа) – неспособность превращения глюкозо-6-фосфата в глюкозу, которая приводит к нарушению как синтеза, так и разложения гликогена. Депонирование гликогена происходит, обратный процесс – нет. Развивается гипогликемия. Накопление избыточного количества гликогена в печени и почках приводит к печеночной и почечной недостаточности. Тип наследования – аутосомно-рецессивный. Причина заболевания – мутация в гене *G6PC*, который кодирует фермент глюкозо-6-фосфатазу. Описано 14 мутантных аллелей этого гена, которые связаны с болезнью Гирке. Существуют молекулярно-генетические тесты для выявления гетерозиготного носительства и пренатальной диагностики этого заболевания.

Нарушения липидного обмена

Болезнь Ниманна-Пика типов А и В – снижение активности фермента кислой лизосомальной сфингомиелиназы, который кодируется геном *SMPD1* (HSA11p15.4-p15.1). Тип наследова-

ния – аутосомно-рецессивный. Нарушение липидного метаболизма приводит к накоплению липидов в печени, легких, селезенке, нервных тканях. Характерна дегенерация нервных клеток, нарушение деятельности нервной системы, повышенный уровень холестерина и липидов в крови. Тип А летален в раннем детском возрасте. Тип Б протекает более мягко, больные, как правило, доживают до взрослого состояния. Разные типы обусловлены разными мутациями в гене *SMPD1*.

Болезнь Гоше (гликозилцерамидный липидоз) – накопление глюкоцереброзидов в клетках нервной и ретикуло-эндотелиальной системы, обусловленное дефицитом фермента глюкоцереброзидазы, которая кодируется геном *GBA* (HSA1q21). Относится к группе лизосомных болезней накопления. Некоторые формы заболевания проявляются в тяжелых поражениях печени, селезенки, нервной и костной тканей.

Наследственные болезни пуринового и пиримидинового обмена

Синдром Леша-Нихена – сцепленное с полом рецессивное заболевание, при котором резко возрастает содержание мочевой кислоты во всех жидкостях тела. Последствием этого является задержка развития, умеренная умственная отсталость, приступы агрессивного поведения с самоповреждением. Недостаточность ферментативной активности гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы по причине мутаций в гене *HPRT1* (HSAXq26-q27.2) лежит в основе этого заболевания. Описаны несколько мутаций в том же гене, следствием которых является *подагра* (нарушение пуринового обмена и отложение мочекислых соединений в тканях).

Нарушения обмена соединительной ткани

Синдром Марфана («паучьи пальцы», арахнодактилия) – поражение соединительной ткани вследствие мутации в гене *FBN1* (HSA15q21.1), ответственном за синтез фибриллина. Наследуется по аутосомно-доминантному типу. Клиническая полиморфность заболевания объясняется большим числом мутантных аллелей, каждый из которых может проявляться в

гетерозиготном состоянии. Для больных характерен высокий рост, астеническое телосложение (непропорционально длинные конечности), арахнодактилия (длинные тонкие пальцы), слабость связочного аппарата, отслойка сетчатки глаза, подвывих хрусталика, пролапс митрального клапана (рис. 99).



Рис. 99. Синдром Марфана*

Мукополисахаридозы – группа заболеваний соединительной ткани, связанных с нарушением обмена кислых гликозаминогликанов (мукополисахаридов), вызванных недостаточностью некоторых лизосомных ферментов. Эти заболевания относят к лизосомным болезням накопления. Они проявляются в различных дефектах костной и соединительной тканей. *Мукополисахаридоз типа I (синдром Хурлера)* – аутосомно-рецессивное заболевание, возникающее в результате дефицита фермента альфа-L-идуронидазы из-за мутаций в гене IDUA (HSA4q16.3). Это приводит к накоплению белково-углеводных комплексов и жиров в клетках организма. В результате у больных наблюда-

* URL: http://www.spineinfo.ru/infosources/case/cases_14.html

ется малый рост, существенная задержка умственного развития, увеличение печени и селезенки, пороки сердца, помутнение роговицы, деформация костей и огрубение черт лица (рис. 100).

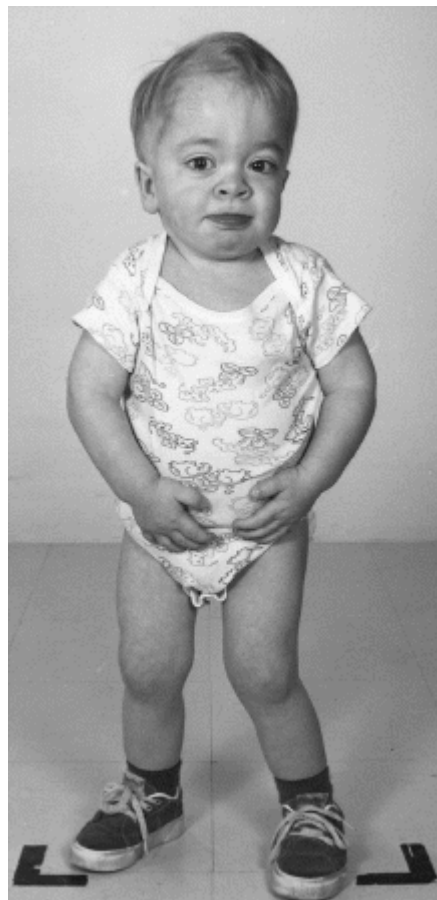


Рис. 100. Синдром Хурлера*

Мукополисахаридоз типа II (синдром Хантера) – сцепленное с полом рецессивное заболевание, которое обусловлено дефектом фермента идуронатсульфотазы из-за мутации в гене IDS (HSAХq28). Веществами накопления являются дерматан- и гепарансульфаты. Характерны грубые черты лица, скафоцефалия, шумное дыхание, низкий грубый голос, частые острые респираторные вирусные инфекции (рис. 101). В возрасте 3–4 лет появляются нарушения координации движений – походка становится неуклюжей, дети при ходьбе часто падают. Для больных характерны эмоциональная лабильность и агрессивность.

* URL: http://medgen.genetics.utah.edu/photographs/pages/hurler_syndrome.htm

Наблюдаются также прогрессирующая тугоухость, узелковые поражения кожи спины, остеоартриты, поражения роговицы.



Рис. 101. Синдром Хантера*

Мукополисахаридоз типа III (синдром Санфилиппо, болезнь Санфилиппо) – заболевание, вызванное накоплением гепарансульфата. Для него характерна генетическая гетерогенность – существуют четыре типа этой болезни, вызванные мутациями в четырех разных генах, кодирующих ферменты, участвующие в метаболизме накапливаемого вещества. Первые симптомы болезни в виде нарушений сна появляются у детей старше трех лет. Постепенно развивается апатия, отмечается задержка психомоторного развития, нарушения речи, черты лица становятся грубыми. Со временем дети перестают узнавать окружающих. Для больных характерны задержка роста, контрактуры суставов, гипертрихоз, умеренная гепатоспленомегалия. В отличие от синдромов Хурлера и Хантера при болезни Санфилиппо преобладает умственная отсталость, а поражения роговицы и сердечно-сосудистой системы отсутствуют.

* URL: <http://1nsk.ru/news/russia/23335.html>



Рис. 102. Синдром Санфилиппо*

Фибродисплазия (оссифицирующий миозит, параоссальная гетеротопическая оссификация, болезнь Мюнхеймера) – заболевание соединительной ткани, связанное с ее прогрессирующим окостенением в результате мутации в гене *ACVR1* (HSA2q23-q24), который кодирует рецептор активина А. Тип наследования – аутосомно-доминантный. Заболевание проявляется врожденными дефектами развития – прежде всего искривленными большими пальцами стоп и нарушениями в шейном отделе позвоночника на уровне позвонков с2 – с7. Заболевание имеет прогрессирующий характер, приводит к значительным нарушениям функционального состояния опорно-двигательного аппарата, глубокой инвалидизации больных и смерти преимущественно в детском и молодом возрасте (рис. 103). Болезнь еще называют «болезнь второго скелета», так как там, где в организме должны происходить штатные противовоспалительные процессы, начинается рост кости.

* URL: <http://runkle-science.wikispaces.com/Sanfilippo-syndrome>



Рис. 103. Фибродисплазия*

Нарушения циркулирующих белков

Гемоглобинопатии – наследственные нарушения синтеза гемоглобина. Различают две группы гемоглобинопатий. Для первой характерно изменение первичной структуры белка глобина, что может сопровождаться нарушениями его стабильности и функции (например, *серповидноклеточная анемия*). При гемоглобинопатиях второй группы структура гемоглобина остается нормальной, снижена лишь скорость синтеза глобиновых цепей (например, *β -талассемия*).

Нарушения обмена веществ в эритроцитах

Наследственный сфероцитоз – врождённая недостаточность липидов оболочки эритроцитов. Для заболевания характерен аутосомно-доминантный или аутосомно-рецессивный тип наследования в зависимости от мутации гена *SPTA1* (HSA1q21), который кодирует эритроцитарный α -1 спектрин. Аномалия этого белка приводит к повышению концентрации

* URL: <http://donbass.ua/news/health/2010/02/15>

ионов натрия внутри эритроцита и проникновению в него избытка воды из-за повышения осмотического давления. Вследствие этого образуются сферические эритроциты – сфероциты, которые в отличие от двояковогнутых нормальных эритроцитов не обладают способностью изменять форму в узких участках кровотока, например при переходе в синусы селезенки. Это приводит к замедлению продвижения эритроцитов в синусах селезенки и отщеплению части мембраны эритроцита с образованием микросфероцитов. Разрушенные эритроциты поглощаются макрофагами селезенки. Гемолиз эритроцитов приводит к гиперплазии клеток пульпы и увеличению селезенки. Одним из основных клинических симптомов является желтуха. Основными симптомами наследственного сфероцитоза являются увеличение селезенки (обычно выступает из-под реберья на 2–3 см) и желтуха. Иногда наблюдаются признаки замедленного развития, нарушения лицевого скелета, башенный череп, седловидный нос, высокое стояние нёба, нарушения расположения зубов, узкие глазницы.

Наследственные болезни обмена металлов

Болезнь Коновалова-Вильсона (гепатоцеребральная дистрофия) – аутосомно-рецессивное нарушение метаболизма меди, приводящее к тяжелейшим поражениям центральной нервной системы и внутренних органов. Заболевание обусловлено низким или аномальным синтезом церулоплазмина (белка, транспортирующего медь) из-за недостаточности ферментативной активности медьпереносящей АТФазы. Мутации (их описано около 200) в гене *ATP7B* (HSA13q14-q21) приводят к изменениям β-полипептида этого фермента, что является генетической основой этой патологии. Основную роль в патогенезе играет нарушение обмена меди, её накопление в нервной, почечной, печёночной тканях и роговице, вследствие чего происходит токсическое повреждение медью данных органов. В печени формируется крупноузловой или смешанный цирроз. В почках в первую очередь страдают проксимальные канальцы. В головном мозге поражаются в большей степени базальные ганглии, зубчатое ядро мозжечка и черная субстанция.

Нарушения всасывания в пищеварительном тракте

Муковисцидоз (кистозный фиброз) – аутосомно-рецессивное заболевание, характеризующееся поражением желез внешней секреции, тяжёлыми нарушениями функций органов дыхания и желудочно-кишечного тракта. Причиной являются мутации гена *CFTR* (HSA7q31.2), который кодирует трансмембранный регулятор кистозного фиброза. Заболевание характеризуется поражением желез внешней секреции, тяжёлыми нарушениями функций органов дыхания и желудочно-кишечного тракта.

Непереносимость лактозы (гиполактазия) – аутосомно-рецессивное патологическое состояние плохого усвоения лактозы (молочного сахара), генетической основой которого являются мутации в регуляторной и кодирующей областях гена *LCT* (HSA2q21), который кодирует лактазу. Этот фермент экспрессируется преимущественно в ресничных клетках кишечника и отвечает за расщепление лактозы на галактозу и глюкозу. Основными симптомами лактазной недостаточности являются метеоризм, боли в животе, диарея, рвота. У детей лактазная недостаточность может проявляться хроническими запорами, беспокойством и плачем после еды. В разных популяциях человека частоты мутантных аллелей варьируют от 1 до 100 %.

Гормональные нарушения

Тестикулярная феминизация (синдром Морриса) – сцепленное с полом рецессивное заболевание, когда при мужском кариотипе (46, XY) проявляется женский фенотип. Экспрессивность варьирует. При неполной феминизации гонады развиваются по мужскому типу, но некоторые половые признаки соответствуют женскому полу с разной степенью выраженности – гипертрофированный клитор, неполное закрытие шва мошонки, мошонкообразные большие половые губы, укороченное влагалище (рис. 104). При полной феминизации основным симптомом является отсутствие менструаций и полового оволосения при хорошо развитых молочных железах и женском фенотипе. Причиной заболевания являются различные мутации в гене *AR* (HSAXq11-q12), который кодирует рецептор андрогена.



Рис. 104. Вид наружных половых органов при неполной тестикулярной феминизации*

Андрогенитальный синдром (женский псевдогермафродитизм) – эндокринное нарушение с аутосомно-рецессивным типом наследования, при котором больная имеет наружные половые органы мужского типа и женскую гормональную структуру. У больных увеличен клитор, который становится похож на мужской половой член с одним уrogenитальным отверстием, отсутствует наружный вход во влагалище, малые половые губы отсутствуют, большие губы похожи на «разрубленную» мошонку. При этом внутренние половые органы могут иметь нормальный вид. Генетической основой заболевания являются мутации гена *CYP21* (HSA6q21.3), который кодирует фермент 21-гидроксилазу группы цитохрома P450, участвующий в синтезе гормонов альдостерона и кортизола.

* URL: http://www.health-ua.org/img/woman/tab1/8_17.jpg

9.4. Молекулярные маркеры в изучении наследственной патологии

Значительная часть наследственных болезней и болезней с наследственной предрасположенностью имеют немногочисленную природу. Их можно отнести к количественным признакам, т. е. тем, которые имеют непрерывный ряд изменчивости и могут быть измерены – например, рост, вес, длина конечностей. Аллели большого числа генов вносят вклад в проявление таких признаков, поэтому их называют полигенными. Проследить их наследование и выявить гены, аллели которых участвуют в патологических процессах, можно при помощи генетических маркеров. Выявление сцепленного наследования (ассоциации) фенотипических признаков с генетическими маркерами позволяет найти районы хромосом, оказывающие решающее влияние на изучаемые процессы (позиционное клонирование), и получить надежные системы для молекулярной диагностики (молекулярное маркирование). В настоящее время наиболее распространенными маркерами в генетике человека являются микросателлитные локусы (рис. 105) и мононуклеотидные полиморфные сайты – SNP (рис. 106), основные особенности которых показаны в таблице.

Таблица

Сравнение основных характеристик SNP и микросателлитов

	SNP	Микросателлиты
Число аллелей в популяции	1–2 (4)	1 – более 20
Средняя гетерозиготность	~0,3	~0,7
Информативность	+	+++
Число локусов в геноме человека	~10 ⁶	~10 ⁵
Возможность автоматизации	+++	+

Анализ экспрессии генов (всех или группы) на биочипах в тканях, имеющих отношение к определенному наследственному заболеванию, в норме и патологии часто позволяет выявить гены-кандидаты для изучаемой болезни. Хромосомную локализацию последовательностей ДНК, влияющих на количественный признак (QTL), можно определить на основе совместного наследования с несколькими близкорасположенными маркерами. Если удастся найти маркеры, ограничивающие QTL с двух

сторон, то на основе данных геномного сиквенса (разд. 7.7 и 8.4) можно составить список генов, являющихся позиционными кандидатами для QTL изучаемого заболевания. При одновременном использовании анализа экспрессии и исследования ассоциаций заболевания с молекулярными маркерами можно определить наиболее вероятные гены-кандидаты – те, которые окажутся в обоих списках.

Степень восприимчивости к определенным лекарственным препаратам и эффективность их применения варьирует в широких пределах. При одном и том же заболевании подходящий для конкретного индивидуума препарат часто подбирают методом проб и ошибок. Кроме потери времени такой подход иногда наносит непоправимый вред здоровью. В настоящее время для большого количества лекарственных средств разработаны системы маркеров на основе SNP, позволяющие *a priori* (до опыта) предсказать реакцию индивидуального организма на то или иное химическое вещество. Ассоциации отдельных аллельных вариантов ДНК-маркеров с особенностями биохимических реакций являются основой индивидуальной терапии (рис. 107).

Микросателлиты

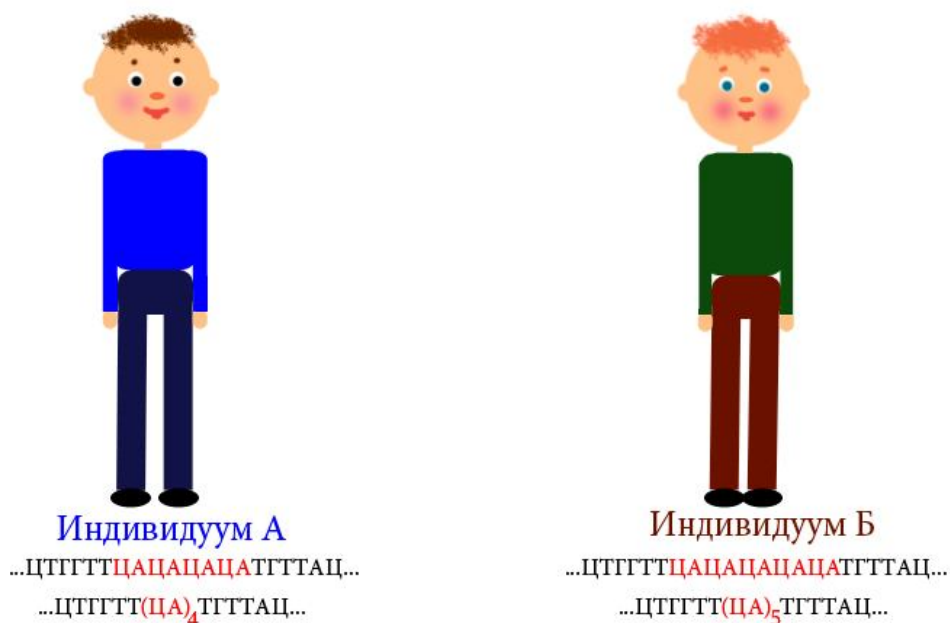


Рис. 105. В микросателлитных локусах единицей изменчивости является группа нуклеотидов

Мононуклеотидные полиморфные сайты (SNP)



Рис. 106. В мононуклеотидных полиморфных сайтах (SNP) единицей изменчивости является один нуклеотид

Подбор индивидуальной терапии

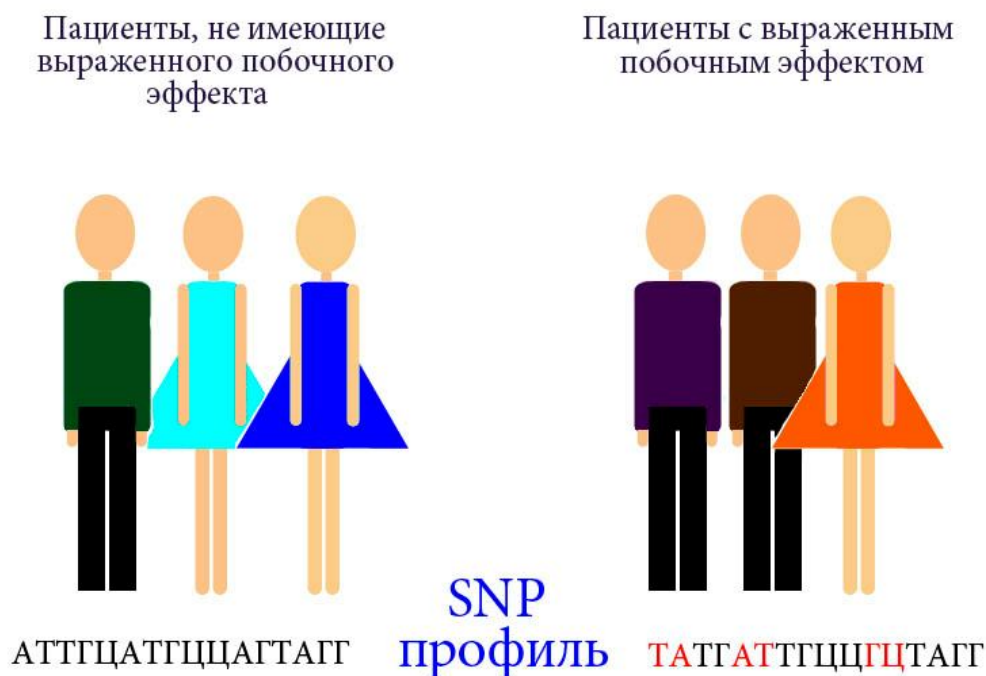


Рис. 107. Принцип подбора индивидуальной терапии на основе полиморфизма мононуклеотидных повторов – SNP

Контрольные вопросы и задания

1. К какой группе наследственных заболеваний можно отнести муковисцидоз?
2. Может ли у гетерозиготы по мутации гена *SPTA1* быть наследственный сфероцитоз?
3. Какое наследственное заболевание вызвано накоплением гепарансульфата?
4. Почему число возможных аллелей SNP четыре?

Глава 10. Цитогенетическая и молекулярно-генетическая диагностика наследственных заболеваний человека

10.1. Диагностика хромосомных болезней

Диагностика хромосомных болезней может проводиться у взрослых индивидуумов любого возраста или пренатально (до рождения) – в этом случае при наличии патологии может быть рекомендовано прерывание беременности. Для проведения пренатальной диагностики требуются показания – наличие хромосомных аномалий в семье, возраст матери старше 35 лет, долговременный контакт с мутагенами, ультразвуковые (например, увеличение межворотникового расстояния) или биохимические маркеры (например, сывороточные) маркеры хромосомной патологии плода. Обычно на 10–11-й неделе проводят биопсию хориона – небольшое количество хориональной ткани отсасывается шприцем через катетер или длинную иглу. Вероятность выкидыша при этой процедуре 2–6 %. Во втором триместре используют плацентоцентез (позднюю биопсию хориона) – процедура аналогична хориоцентезу, но объектом лабораторного исследования при этом являются клетки плаценты. На 15–16-й неделе иногда проводят амниоцентез: из амниотической жидкости выделяют находящиеся в ней клетки плода (слущенные клетки кожи плода, эпителиоциты из мочевыводящих путей и т. д.), которые культивируют для получения препаратов хромосом. Риск выкидыша при этом способе – около 1 %. Обычно клеток выделяется мало, размножить их в значительной степени затруднительно, поэтому провести полноценный кариологический анализ на митотических хромосомах (гл. 5) не всегда возможно.

В последние годы для пренатальной диагностики все более широко применяется FISH с хромосомоспецифическими ДНК-зондами на интерфазных ядрах или CGH – сравнительная геномная гибридизация, которые не требуют получения клеток на стадии метафазы (разд. 5.5). Наконец, после 18-й недели используют кордоцентез – образцы крови плода получают из вены пуповины. Риск осложнений при последнем способе минимален, но прерывание беременности в случае обнаружения серьезной патологии в этот период требует длительной госпитализации и чревато осложнениями.

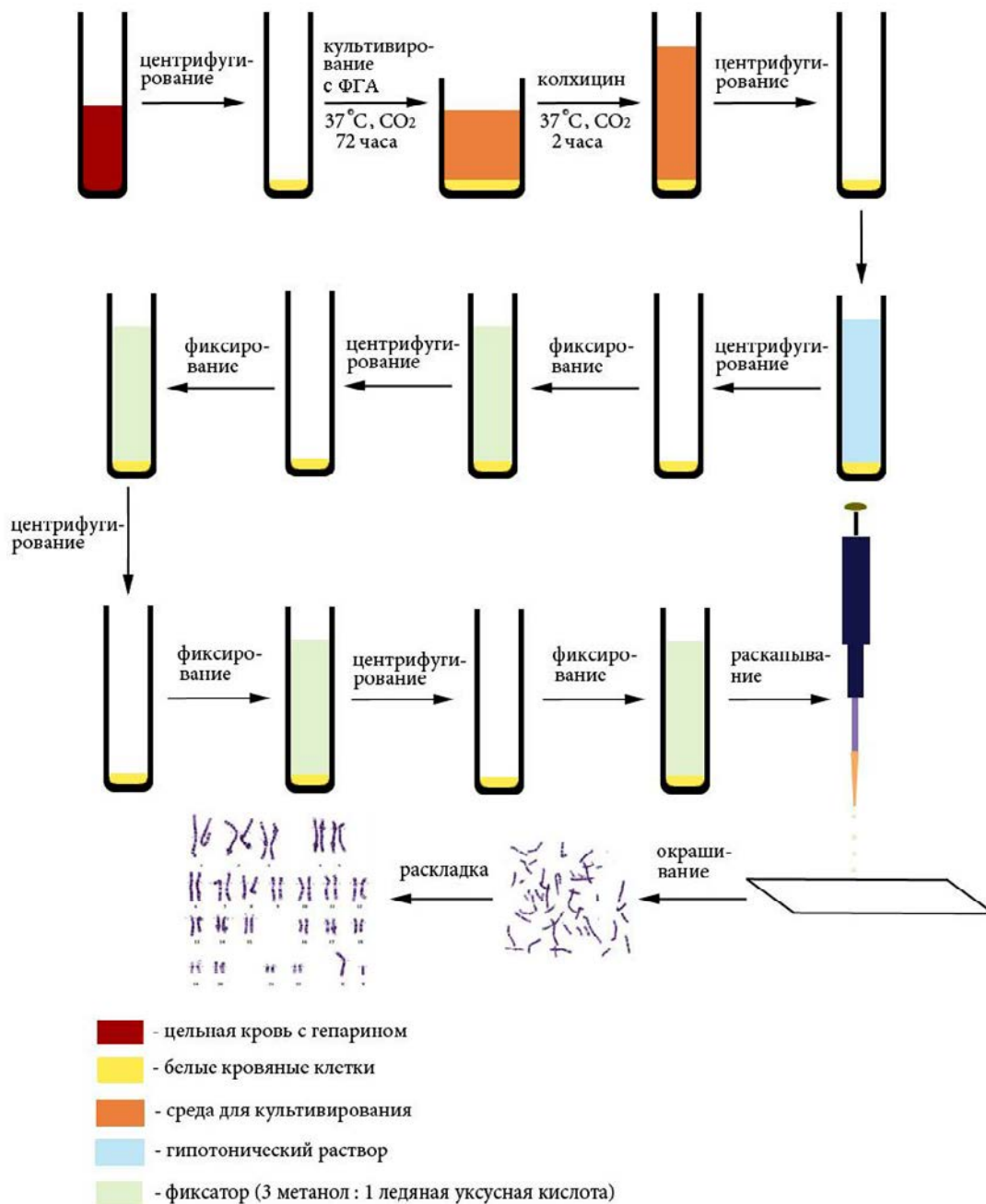


Рис. 108. Приготовление препаратов митотических хромосом из культуры лейкоцитов периферической крови

Основным методом диагностики хромосомных аномалий после рождения является цитогенетический (кариологический) анализ на метафазных хромосомах. Иногда применяют методы экспресс-диагностики на интерфазных клетках. Например, для быстрого подсчета числа X-хромосом клетки буккального эпителия окрашивают ацетоорсеином или любым неспецифическим красителем. При кариотипе 46, XX в ядре присутствует

относительно крупная плотная глыбка – тельце Барра – инактивированная X-хромосома. У мужчин тельце Барра отсутствует. Нетрудно догадаться, что число телец Барра равно числу X-хромосом за вычетом единицы. Для выявления Y-хромосомы в интерфазе используют окраску АТ-специфическими флуорохромами. При этом крупный гетерохроматиновый блок длинного плеча Y-хромосомы очень ярко флуоресцирует. Число таких блоков соответствует числу Y-хромосом. Для получения препаратов митотических хромосом чаще всего используют культуры лейкоцитов периферической крови (рис. 108). Методы дифференциального окрашивания хромосом, принципы кариологического анализа на митотических хромосомах и описание основных хромосомных заболеваний представлены в гл. 5. В последние годы как отдельную группу хромосомных аномалий выделяют микроцитогенетические синдромы (микроделеции и микродупликации). Для их диагностики используют молекулярно-цитогенетические методы (разд. 5.5).

10.2. Диагностика гетерозиготного носительства и определение генетического риска моногенных заболеваний

Молекулярно-генетическая диагностика проводится прямым методом (если при этом анализируют ген, непосредственно вовлеченный в патологию) или косвенным (при помощи ассоциированных с заболеванием ДНК-маркеров). Основными методами молекулярно-генетической диагностики являются ПЦР и секвенирование (разд. 7.5 и 7.6). Биологическим образцом для выделения ДНК может быть любая ткань. Чаще используют соскоб буккального эпителия (с внутренней стороны щеки), периферическую кровь или волосяные луковицы, потому что их получение наименее травматично. Для диагностики наследственных заболеваний у умерших можно использовать костные останки или фрагменты мумий. Выделение ДНК проводят фенолхлороформным методом или путем очистки на колонках. Результаты ПЦР обычно анализируют при помощи капиллярно-

го электрофореза (рис. 109). Молекулярно-генетическая диагностика может проводиться как пренатально, так и в любом возрасте после рождения, так как ДНК не изменяется в онтогенезе.

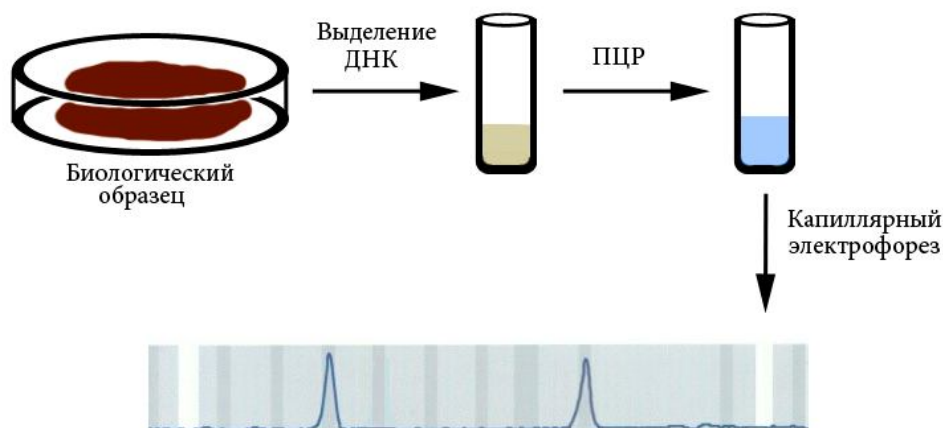


Рис. 109. Схема наиболее типичного способа молекулярно-генетической диагностики

Полногеномное секвенирование (в ряде случаев экзомное) позволяет преодолеть существующие ограничения применяемых молекулярно-генетических и цитогенетических диагностических методов – ограниченность числа анализируемых генов и аллелей, недостаточность данных по ранее неописанным мутациям в случае клинически полиморфных и генетически гетерогенных (когда различные клинические формы вызваны разными мутациями одного гена или множественный аллелизм характерен для одной формы) заболеваний, относительная трудоемкость, сложность обновления (апгрейда), дороговизна приборов и расходных материалов. Следует отметить, что при применении классических подходов требуется повторять процедуры для диагностики предрасположенности или гетерозиготного носительства при каждом новом подозрении, а полногеномное секвенирование позволяет получить раз и навсегда неизменный набор цифровых данных, который требует лишь своевременной интерпретации при помощи анализа баз данных.

Расчет генетического риска при моногенных заболеваниях основан на законах Менделя (гл. 2). Если один из супругов является гомозиготой по аллелю дикого типа (отсутствие заболевания), а генотип второго супруга неизвестен, то риск рождения больного ребенка соответствует частоте встречаемости данного заболевания в популяции. При полной пенетрантности в семье гетерозигот по аутосомно-рецессивному заболеванию риск рождения больного ребенка – 25 %. При неполной пенетрантности необходимо внести поправку. Например, при пенетрантности 80% у гетерозигот по аутосомно-рецессивному заболеванию риск составит $25 \% \times 0,8 = 20 \%$. В случае аутосомно-доминантных заболеваний с поздней манифестацией вносят дополнительные поправки с учетом возраста пробанда.

Контрольные вопросы и задания

1. У пациента обнаружено три тельца Барра. Каков его предполагаемый кариотип?
2. Оба супруга – гетерозиготы по мутации гена *LCT*. Каков риск рождения ребенка с непереносимостью лактозы?
3. Рассчитайте генетический риск рождения мальчика с синдромом Леша-Нихена у гетерозиготной по мутации гена *HPRT1* матери и здорового отца.

Глава 11. Наследственные нарушения умственного и физического развития

11.1. Роль генетических факторов в возникновении расстройств речи

Возникновение большинства расстройств речи гипотетически связано с влиянием наследственных факторов. На этот факт указывают семейный характер этих патологических состояний и конкордантность по ним у монозиготных близнецов. В некоторых случаях известна генетическая природа речевых нарушений.

Алалия – отсутствие или недоразвитие речи у детей при нормальном слухе и первично сохраненном интеллекте. Одна из наследственных форм этого патологического состояния – *вербальная диспраксия* – имеет аутосомно-доминантный тип наследования и обусловлена мутациями гена *FOXP2* (HSA7q31), который кодирует транскрипционный фактор семейства Forkhead.

Ринолалия (гнусавость) – изменение тембра голоса и искаженное произношение звуков, вызванное нарушением резонаторной функции носовой полости. Одна из причин этого дефекта звукопроизношения – врожденное расщепление нёба (рис. 110) – симптом, который присутствует при некоторых хромосомных абберациях (разд. 5.8 и 5.9). В некоторых популяциях сочетания мутантных аллелей (гаплотипы) гена *GAD1* (HSA2q31), который кодирует глутаматкарбоксилазу 1, приводят к расщеплению нёба.

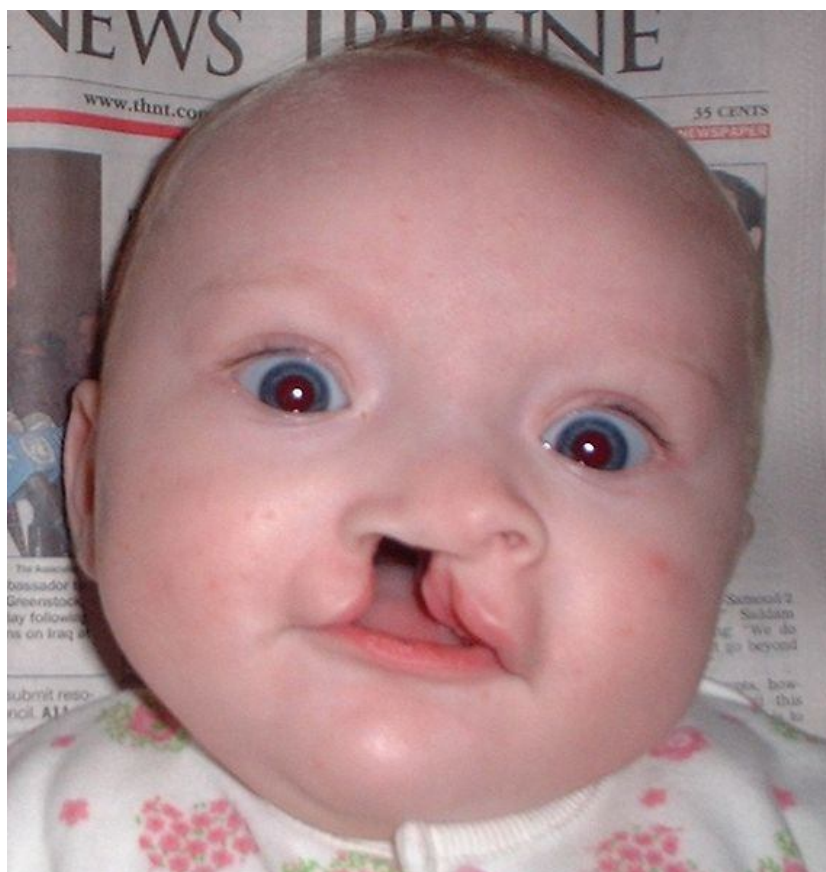


Рис. 110. Расщепление нёба*

Предрасположенность к *дислексии* – нарушению способности к обучению читать и писать при нормальном интеллекте – аутосомно-доминантный признак, обусловленный мутациями в гене *DYX1C1* (HSA15q21), продукт которого отвечает за взаимодействие рецептора эстрогена с белками теплового шока Hsp70 и Hsp90. На проявление этого признака также оказывают влияние гены, расположенные на HSA6 и HSA11.

Миссенс-мутация в гене N-ацетилглюкозамин-1-фосфаттрансферазы *GNPTAB* (HSA12q23.3) является причиной *заикания*. Кроме того, существует еще одна наследственная форма этого речевого нарушения, предполагаемый локус которого – HSA18p11.3-p11.2.

* URL: http://ru.wikipedia.org/wiki/Файл13900470_3PREOPERATION0.jpg

11.2. Наследственные формы интеллектуальных нарушений

Умственная отсталость (интеллектуальная недостаточность), выражающаяся в стойком нарушении познавательной деятельности, характерна для многих хромосомных и генных болезней как симптом.

Наиболее типичные хромосомные аномалии, при которых наблюдается умственная отсталость – *синдром Дауна, синдром Шерешевского-Тернера, синдром Клайнфельтера и синдром Мартина-Белл* – описаны в разд. 5.8 и 5.9.

Умственная отсталость характерна для *фенилкетонурии, некоторых мукополисахаридозов и болезни Нимана-Пика* (разд. 9.3).

Гомоцистинурия – накопление метионина и гомоцистина по причине недостаточности фермента печени цистатионинсинтетазы, которое приводит к поражению костной ткани и ЦНС. У больных детей отмечается задержка роста, умственная отсталость, судороги, остеопороз, эктопия хрусталика, склонность к тромбозам. Общий вид больных напоминает *синдром Марфана* (разд. 9.3), главной отличительной особенностью является умственная отсталость. Заболевание прогрессирует быстро, больные обычно умирают в молодом возрасте. Тип наследования этого заболевания – аутосомно-рецессивный. Генетическая природа гомоцистинурии – различные мутации гена *CDS* (HSA21q22.3), который кодирует цистатионинсинтетазу.

Истинная микроцефалия – аутосомно-рецессивное заболевание, проявляющееся в меньшем объеме головного мозга и меньшем размере мозгового черепа, чем у здорового индивидуума (рис. 111). При истинной микроцефалии в отличие от синдромов, при которых она присутствует в качестве симптома, отсутствуют пороки скелета и неврологические нарушения (кроме умственной отсталости). Причиной заболевания являются мутации гена *ASPM* (HSA1q31), кодирующего белок аномального веретена деления, который участвует в пролиферации эмбриональных фибробластов. Интересно, что впервые этот ген был описан у плодовой мушки *Drosophila*

melanogaster (гл. 2), причем функция его та же, что и у человека. Это пример использования эволюционного консерватизма (разд. 8.3) в медицинской генетике.



Рис. 111. Истинная микроцефалия*

Обтурационная гидроцефалия (гидроцефалия, вызванная наследственным стенозом Сильвиева водопровода) – X-сцепленное рецессивное заболевание с прогрессирующей неврологической симптоматикой, вызванное нарушением оттока цереброспинальной жидкости из первых трех мозговых желудочков. Молекулярно-генетическая основа заболевания – мутация в экзоне 22 гена *L1CAM* (HSAХq28), который кодирует один из белковых доменов молекулы клеточной адгезии L1.

Синдром Сотоса (мозговой гигантизм) – аутосомно-доминантный гигантизм, не связанный с гормоном роста.

* URL: <http://ru.wikipedia.org/wiki/Файл:IMGP2147.JPG>

До 4–5 лет ребенок с таким синдромом растет почти вдвое быстрее, чем обычный. Характерны задержка развития и непрогрессирующая умственная отсталость. У больных большие кисти и стопы с утолщенным слоем подкожной жировой ткани. Голова большая, нижняя челюсть выступает вперед, глаза широко расставлены (рис. 112). Причиной заболевания могут быть микроделеции (разд. 10.1) в районе HSA5q35 либо мутации расположенного в том же хромосомном районе гена *NSD1*, который кодирует ассоциированный с андрогеновым рецептором корегулятор 267.



Рис. 112. Синдром Сотоса*

Синдром Смита-Магенуса характеризуется умственной отсталостью, гиперактивностью поведения, резко повышенной

* URL: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Sotos.jpg>

сонливостью, черепно-лицевыми аномалиями, наличием широких коротких рук, склонностью к нанесению повреждений самому себе. Синдром обусловлен делецией величиной 3,7 млн п.н. в районе HSA17p11.2 или мутациями локализованного в том же районе индуцируемого ретиноидной кислотой гена 1 – *RAI1*.

Синдром Вильсона (синдром «лица эльфа») – аутосомно-доминантное заболевание, вызванное делециями величиной 1,5–2,5 млн п.н. в районе HSA7q11.23. Больные имеют особое строение лица, называемое «лицом эльфа», поскольку оно напоминает этих мифологических персонажей в их классическом понимании. Для этого синдрома характерны широкий лоб, разлёт бровей по средней линии, опущенные вниз полные щёки, большой рот с полными губами (особенно нижней), плоская переносица, нос с плоским тупым концом, маленький, слегка заострённый подбородок (рис. 113). Окраска глаз обычно ярко-голубая, со звёздчатой картиной радужки и склерами синеватого цвета. Для этого синдрома характерен дефицит наглядно-образного мышления и слабые вербальные способности.



Рис. 113. Синдром Вильсона*

* URL: <http://beehive.thisishull.co.uk/default.asp?WCI=SiteHome&ID=8457>

Туберозный склероз (болезнь Бурневилля) – аутосомно-доминантное полисистемное заболевание, при котором во множестве органов и тканей образуются доброкачественные опухоли. Повреждения головного мозга, которые происходят обычно на границе серого и белого вещества, могут вызвать эпилепсию, снижение интеллекта. Характерные новообразования кожи лица и глазного дна могут быть использованы при начальной диагностике (рис. 114). Мутации в генах *TSC1* (HSA9q34) и *TSC2* (HSA16q13.3), которые кодируют соответственно гамартин и туберин, являются причиной этого заболевания.



Рис. 114. Повреждения кожи при туберозном склерозе*

Синдромы Прадера-Вилли и Ангельмана обусловлены микроделецией в районе HSA15q11-q13. Если aberrантная хромосома приходит от отца, развивается синдром Прадера-Вилли (ожирение, склонность к перееданию, гипотонус, нарушение координации движений, маленькие кисти и стопы, низкий рост, повышенная сонливость, косоглазие; пониженная плотность костей, гипогонадизм, речевая задержка, задержка психическо-

* URL: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:TuberSclerosisCase-143.jpg>

го развития, отставание в освоении навыков общей и мелкой моторики) (рис. 115), если от матери – синдром Ангельмана (размер головы меньше среднего, нередко с уплощением затылка, задержка в развитии навыков общей моторики, задержка речевого развития, дефицит внимания и гиперактивность, сложности с обучением, часто эпилепсия, необычные движения – мелкий тремор, хаотические движения конечностей, частый смех без повода, ходьба на негнущихся ногах) (рис. 116). Различия в метилировании цитозина в мужском и женском организмах приводят к различному проявлению одной и той же мутации в зависимости от того, кто из родителей передал аномальную хромосому ребенку. Такое явление называется геномный импринтинг.



*Рис. 115. Синдром Прадера-Вилли**

* URL: http://www.medico.ru/cgi-bin/medatlas/comment.pl?rlink=&publ=1115220228_01_168&page=



Рис. 116. Синдром Ангельмана*

Синдром Корнелии де Ланге – аутосомно-доминантное заболевание, при котором больные отстают в росте и массе тела, имеют своеобразное строение лица (густые сросшиеся брови, длинные густые ресницы, короткий нос с развернутыми ноздрями и сдавленным переносьем) и мозгового отдела черепа (микроцефалия, брахицефалия) (рис. 117). Для больных характерны небольшие кисти, синдактилия стоп, гипертрихоз туловища и конечностей, мраморная кожа, мышечная гипотония. Пациенты часто страдают заболеваниями верхних дыхательных путей, почти у всех наблюдается умственная отсталость. Причина заболевания – мутации в гене *BIPBL* (HSA 5p13.1), который кодирует делангин.

* URL: <http://www.primehealthchannel.com/angelman-syndrome-symptoms-pictures-causes-life-expectancy-and-treatment.html>



Рис. 117. Синдром Корнелии де Ланге*

Синдром Рубинштейна-Тейби (амстердамская карликовость) – аутосомно-рецессивное заболевание, при котором длина и масса тела больных значительно отстают от нормы, череп уменьшен, брахицефальной структуры, наблюдаются аномалии строения верхних конечностей: кисти небольших размеров, короткий второй палец и проксимально расположенный первый палец, искривленный пятый. Нередко отмечается синдактилия стоп (рис. 118). На коже у больных, кроме гипертрихоза, резко выраженного в области спины и поясницы, нередко отмечается общая мраморность, характерны краснота кончика носа, цианоз носогубной области. Умственная отсталость определяется практически у всех больных с данным синдромом. Иногда наблюдается стремление к аутоагрессии и склонность к стереотипным движениям. Для этого синдрома характерна генетическая гетерогенность – причиной могут быть мутации в гене *CREBP* (HSA16p13.3) и в гене *EP300* (HSA22q13), которые кодируют CREB-связывающий белок и гистон-ацетилтрансферазу, соответственно.

* URL: <http://kidneeds.ru/de-Lange/sindrom-kornelii-de-lange.html>

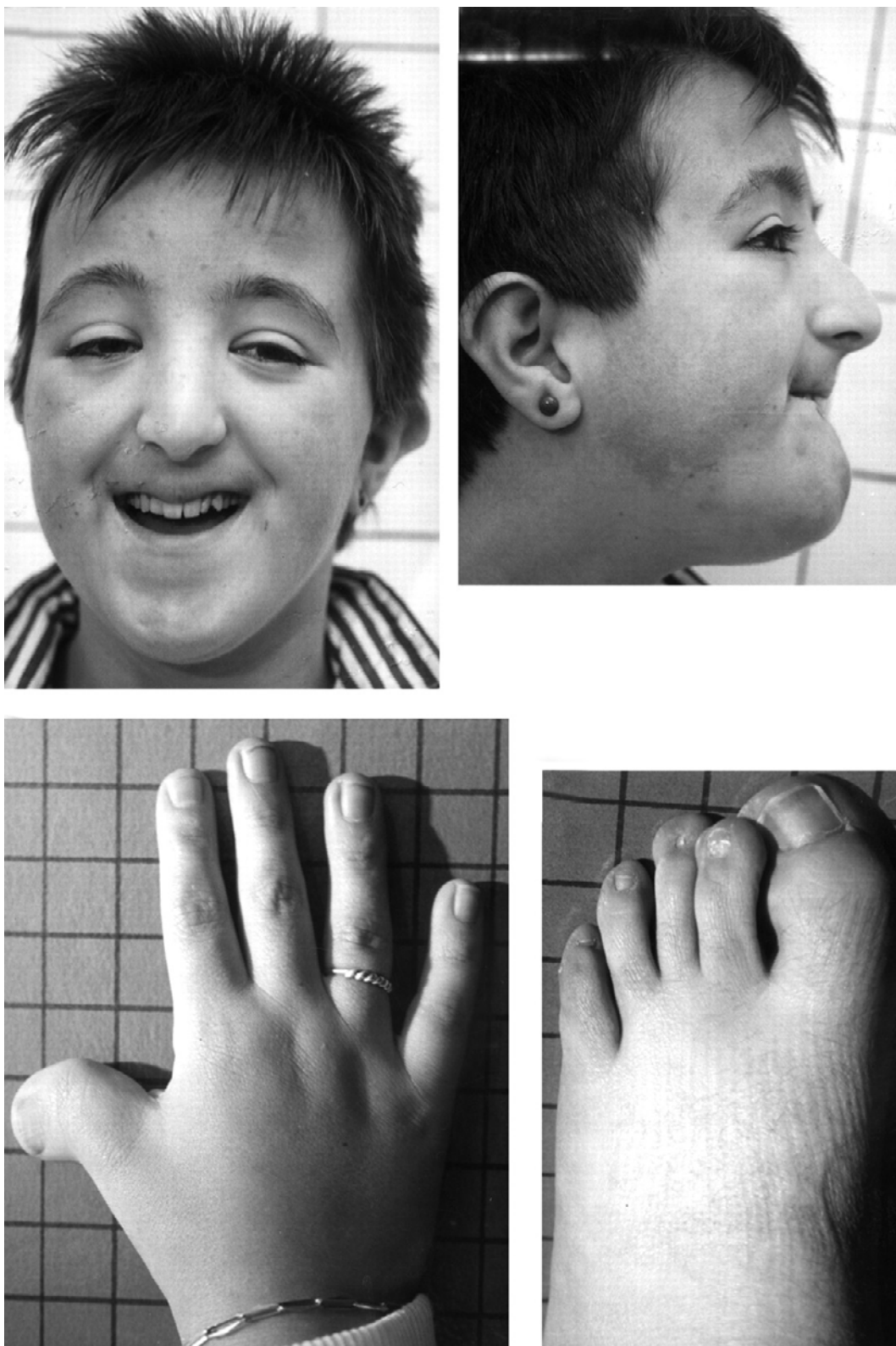


Рис. 118. Синдром Рубинштейна-Тейби*

* URL: <http://bjo.bmj.com/content/84/10/1177/F1.large.jpg>

11.3. Генетика эмоционально-личностных расстройств и девиантного поведения

Шизофрения – группа прогрессирующих психических заболеваний, протекающих с характерными изменениями личности – эмоциональное оскудение, утрата единства, потеря связи с реальностью, расстройства мышления и развитие бредовых, кататонических и аффективных расстройств. Описано 14 различных локусов, связанных с предрасположенностью к заболеваниям подобного рода, в районах 5q33-q35, 11q14-q21, 6p23, 22q11, 6q13-q26, 8p22-p21, 13q32, 18p, 1q42, 15q15, 10q22, 1p36.2, 15q13.3, 2q32.1.

Ранний детский аутизм – нарушение развития нервной системы, для которого характерно наличие триады: недостаток социальных взаимодействий, нарушенная взаимная коммуникация, ограниченность интересов и повторяющийся репертуар поведения. Это расстройство возникает в результате нарушения развития головного мозга и характеризуется выраженным и всесторонним дефицитом социального взаимодействия и общения, а также ограниченными интересами и повторяющимися действиями. Все указанные признаки проявляются в возрасте до трёх лет. Схожие состояния, при которых отмечаются более мягкие признаки и симптомы, относят к расстройствам аутистического спектра. Заболевание отличается генетической гетерогенностью – известно 17 аутосомных: 7q22, 7q11, 13q14, 15q11, 2q, 17q11, 17q21, 3q25-q27, 7q31, 7q36, 1q41, 21p13-q11, 12q14, 16p11.2, 7q35-q36, 3q24, 11q13 и три X-сцепленных локуса предрасположенности к аутизму. В некоторых случаях известны мутации определенных генов, связанные с этим заболеванием. Например, три X-сцепленные формы этого заболевания обусловлены мутациями в генах *NLGN3* (HSA Xq13), *NLGN4* (HSA Xp22.33) и *MECP2* (HSA Xq28), которые кодируют нейролигин 3, нейролигин 4 и метил-CpG-связывающий белок 2 соответственно. Три аутосомные формы – AUTS15, AUTS16 и AUTS17 – вызваны мутациями в генах *CNTNAP2* (HSA 7q35-q36), *SLC9A9* (HSA 3q24) и *SHANK2* (HSA 11q13).

Синдром дефицита внимания и гиперактивности (СДВГ) – неврологическо-поведенческое расстройство разви-

тия, которое начинается в детском возрасте и проявляется в трудности концентрации внимания, гиперактивности и плохо управляемой импульсивности. СДВГ можно диагностировать, начиная с позднего дошкольного или школьного возраста, так как для постановки диагноза необходима оценка поведения ребенка как минимум в двух условиях обстановки (например, дома и в школе). Наличие нарушений обучения и социальных функций является необходимым критерием для установления диагноза СДВГ. Одним из главных признаков СДВГ, наряду с нарушениями внимания, является импульсивность – недостаток контроля поведения в ответ на конкретные требования. Такие дети быстро реагируют на ситуации, не дожидаясь указаний и инструкций, которые позволяют выполнить задание, и неадекватно оценивают требования задания. Они очень небрежны, невнимательны, беспечны и легкомысленны, не всегда могут рассмотреть потенциально негативные последствия своих поступков. Показана связь СДВГ с мутациями в восьми генах: *DRD5* (HSA4p16), *DAT1* (HSA5p15), *HTR1B* (HSA6q1), *ADRA2A* (HSA10q24), *DRD4* (HSA11p15), *SCN8A* (HSA12q13), *SNAP25* (HSA20p11.2) и *COMT* (HSA22q11).

Предрасположенность к алкоголизму в первую очередь обусловлена мутантными аллелями генов кластера *ADH* (HSA4q22), кодирующих различные субъединицы алкогольдегидрогеназы. Этот фермент катализирует окисление спиртов до альдегидов и кетонов. При его дефиците этанол накапливается в организме, что усиливает токсическое действие алкоголя. Известно, что в районах традиционного употребления виноградного вина (например, Средиземноморье, Кавказ) наблюдается наименьшая частота встречаемости аллелей, кодирующих дефектную алкогольдегидрогеназу. Высокая частота мутантных аллелей наблюдается в Скандинавии, среди индейцев и азиатских монголоидов, что во многом определяет большее распространение алкоголизма у этих народов.

Кроме генов *ADH*, на развитие алкогольной зависимости влияют гены *SNCA* (HSA4q22.1), *GABRA2* (HSA5q34), *NPY* (HSA7p15), *TAS2R16* (HSA7q31), *TAS2R38* (HSA7q35), *CHRM2* (HSA7q35), *ANKK1* (HSA11q23), *DRD2* (HSA11q23), *ALDH2* (HSA12q24), *NRXN3* (HSA14q), *SLC6A4* (HSA17q) и гены опиоидных рецепторов.

Криминальное поведение характерно для лиц, страдающих некоторыми хромосомными болезнями (например, синдром Клайнфельтера, синдром дополнительной Y-хромосомы – разд. 5.8).

Кроме того, на большой выборке (более 14000) осужденных, которые были приемными детьми, было показано наличие корреляций (статистических связей) по криминальному поведению с биологическими родителями и отсутствие таковой с приемными родителями. Это свидетельствует о значительном влиянии наследственных факторов в склонности к совершению преступлений.

11.4. Наследственные формы нарушений опорно-двигательного аппарата

Прежде всего следует отметить, что микро- и макроцефалия, деформация грудной клетки и позвоночника, шеи и другие аномалии опорно-двигательного аппарата характерны для многих хромосомных болезней (разд. 5.8 и 5.9).

Группа заболеваний – *дисплазия соединительной ткани (ДСТ)* (синонимы: *гипермобильный синдром, наследственная коллагенопатия, врожденная соединительнотканная недостаточность*) – насчитывает около 200 генетически гетерогенных и клинически полиморфных патологических состояний, обусловленных нарушением развития соединительной ткани в эмбриональном и постнатальном периодах. Для этой группы характерны дефекты волокнистых структур и основного вещества соединительной ткани, которые приводят к различным морфофункциональным нарушениям висцеральных и локомоторных органов с прогрессивным течением. В основе этих заболеваний лежат мутации генов, прямо или опосредованно ответственных за синтез и пространственную организацию коллагена.

Выделяют дифференцированную и недифференцированную дисплазию соединительной ткани. Дифференцированная ДСТ включает в себя синдромы несовершенного остеогенеза, Элерса-Данлоса, Марфана, Стиклера, эластической псевдоксантомы, гаргоилизма и др. Недифференцированная ДСТ – определяющий вариант ДСТ с клиническими проявлениями, не укладывающимися в структуру наследственных синдромов (объединенных под общим названием «гипермобильность»).

Несовершенный остеогенез (НО) – группа аутосомно-доминантных заболеваний, связанных с недостатком коллагена или с его качественным несовершенством (рис. 119). Поскольку коллаген является основным белком костной ткани, для этой группы заболеваний характерна ломкость и деформации костей. Известно восемь типов НО с разной степенью поражения костной и соединительной ткани, большинство из которых вызваны различными мутациями в генах α -1- и α -2-цепей коллагена первого типа – COL1A1 (HSA 17q21.31-q22) и COL1A2 (HSA 7q22.1).

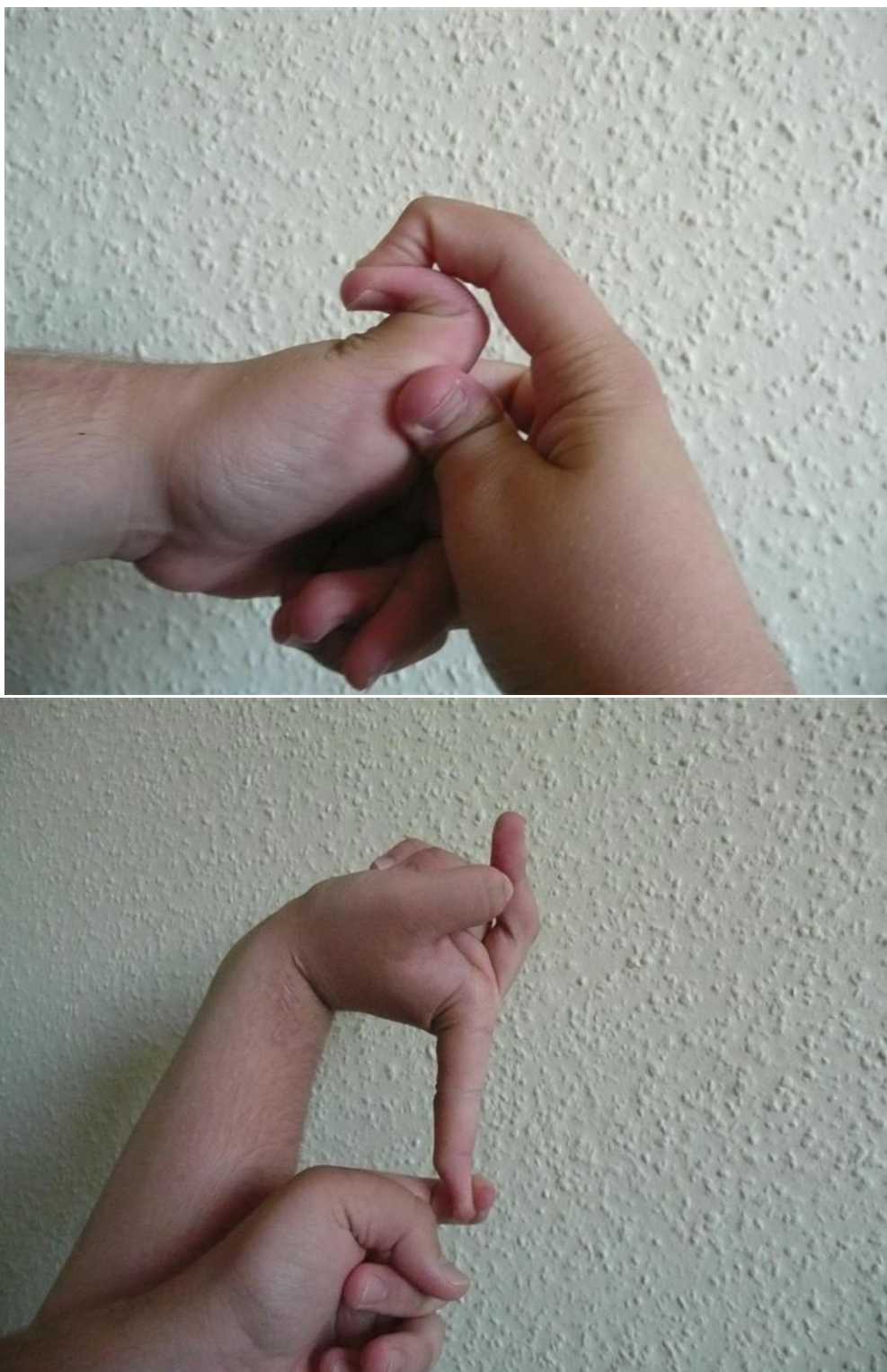


Рис. 119. Несовершенный остеогенез*

Синдром Марфана – описан в разд. 9.3.

Синдром Элерса-Данлоса (гиперэластичность кожи, несовершенный десмогенез Русакова) – группа заболеваний, вызванных повреждением или недостатком коллагена типов I, III и V. При этих болезнях повреждаются суставы, кожа и кровеносные сосуды. Характерны свободные, сильно гнущиеся суставы, гладкая или эластичная, легкоповреждающаяся кожа, неправильное заживление ран и формирование шрамов, маленькие и хрупкие кровеносные сосуды. Все типы синдрома затрагивают суставы, вызывая их гиперподвижность, что позволяет больным выходить за пределы нормального диапазона движений (рис. 120).

* URL: <http://forum.materinstvo.ru/index.php?showtopic=236470>



*Рис. 120. Гиперподвижность суставов при синдроме Элерса-Данлоса**

* URL: http://ru.wikipedia.org/wiki/Синдром_Элерса_—_Данлоса

Типы I и II (классические) – аутосомно-доминантные заболевания соединительной ткани, для которых характерна гладкая, сильно эластичная, легкоранимая кожа, уродливые или необычайно обширные шрамы, гиперподвижные суставы, тенденция к вывихам, склонность к развитию грыжи или смещению любого внутреннего органа. Молекулярно-генетической основой этих типов синдрома являются мутации в генах *COL5A1* (HSA 9q34.2-q34.3), *COL5A2* (HSA 2q31) и *COL1A1* (HSA 17q21.31-q22).

Тип III (гиперподвижность) имеет аутосомно-доминантный тип наследования, проявляется в наличии свободных, нестабильных суставов, плоскостопии, высоком и узком нёбе, раннем начале остеопороза, поражениях сердца. Причиной являются мутации в гене *COL3A1* (HSA 2q31).

Тип IV (сосудистый) наследуется по аутосомно-доминантному типу. Для него (кроме общих для синдрома симптомов) характерна хрупкость стенок сосудов оболочек органов и нежной кожи, склонность к разрывам и образованию аневризмы. Так же как и в случае гиперподвижности, этиологической причиной являются мутации в гене *COL3A1* (HSA 2q31).

Остальные типы синдрома Элерса-Данлоса встречаются достаточно редко, наследуются по аутосомно-доминантному, аутосомно-рецессивному или X-сцепленному рецессивному типу, могут быть связаны с мутациями в генах цепей различных коллагенов или ферментов, участвующих в синтезе коллагена и сборке коллагеновых волокон.

Гаргоилизм (мукополисахаридозы) – описан в разд. 9.3.

Ахондроплазия – аутосомно-доминантная карликовость из-за недоразвития длинных костей. Средний рост больных мужчин – 131 см, больных женщин – 123 см. При ахондроплазии отмечается существенное укорочение конечностей при нормальной длине тела, относительная макроцефалия, короткие пальцы, седловидный нос (рис. 121). Интеллект, как правило, не поврежден. Молекулярно-генетической причиной этого заболевания являются мутации в гене *FGFR3* (HSA 4p16.3), который кодирует рецептор-3 фактора роста фибробластов.



Рис. 121. Пример аходроплазии – Джейсон Акуна, телеведущий*

Миотоническая дистрофия (болезнь Шнайнерта) – много-системное наследственное заболевание, основным симптомом которого является запаздывание расслабления мышц после их сокращения. Это аутосомно-доминантное заболевание с манифестацией в возрасте 20–40 лет. Первые признаки заболева-

* URL: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Jason_Acuña_-_Wee-Man_-_Waterfront_Marriott,_Portland,_Oregon_-_August_15,_2009_-_Full_Body.jpg

ния отмечаются в мышцах лица, шеи, рук и ног. Отмечаются опущение век глаз (птоз), слабость мышц лица и речедвигательные нарушения. Наряду с этим характерны катаракты, гипогонадизм, кисты яичника, прогрессирующая умственная отсталость. Болезнь вызвана экспансией тринуклеотидных повторов ЦТГ 3'-фланкирующем районе гена протеинкиназы миотонической дистрофии *DMPK* (HSA19q13.2-q13.3).

Дистрофия Дюшенна – сцепленная с полом рецессивная прогрессирующая мышечная дистрофия. Первые признаки заболевания проявляются в возрасте 1–3 лет слабостью мышц тазового пояса. Для этого заболевания характерны симметричная атрофия мышц в сочетании с сердечно-сосудистыми, костно-суставными и психическими нарушениями (рис. 122). Костно-суставные нарушения при дистрофии Дюшенна характеризуются деформациями позвоночника, стоп, грудины. Этиологическая причина заболевания – различные мутации в гене *DMD* (HSAХр21.2), который кодирует аподинострофин 1.



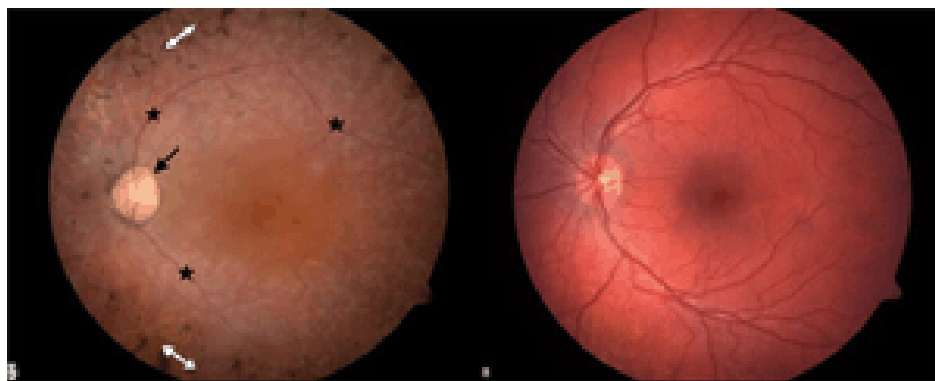
Рис. 122. Миодистрофия Дюшенна*

* URL: <http://www.growingyourbaby.com/2010/09/08/tutus-for-tanner/nikon-2010-071-685x1024/>

11.5. Наследственные формы глухоты и тугоухости в детском возрасте

Микротия с атрезией наружного слухового прохода и проводящей тугоухостью – наследственное заболевание с невыясненной генетической природой, для которого характерны отсутствие или существенная деформация ушной раковины и отсутствие просвета слухового канала. Показано достоверное различие конкордантности по этому признаку у однояйцовых и разнаяйцовых близнецов.

Синдром Ушера – аутосомно-рецессивное заболевание, которое проявляется во врожденных нарушениях слуха различной степени, прогрессирующей пигментной дегенерации сетчатки (рис. 123), приводящей к постепенному сужению полей зрения и слепоте, и иногда потере чувства равновесия. В мире 5–6 % от общего числа людей с любыми нарушениями слуха и 50 % слепоглухих страдают этим синдромом. Клинический полиморфизм определяется генетической гетерогенностью – известно 12 локусов, связанных с разными типами этого заболевания. Наиболее известна форма синдрома Ушера, вызванная мутациями гена *MYO7A* (HSA11q13.5), который кодирует миозин 7А.



*Рис. 123. Фотография сетчатки при синдроме Ушера (слева) и в норме (справа). Зрительный нерв (обозначен черной стрелкой) бледный, сосуды тонкие (обозначены звездочками), присутствуют пигментные гранулы (обозначены белыми двойными стрелками)**

* URL: http://my.clevelandclinic.org/disorders/usher_syndrome/hic_usher_syndrome.aspx

Синдром Крузона (черепно-лицевой дизостоз) – аутосомно-рецессивное заболевание, вызванное преждевременным срастанием венечного и сагитального швов черепной коробки. Для синдрома характерно западание глазниц и костей щек, выпученные глаза, вдавленное переносье, выступающая челюсть (рис. 124). У большинства больных отмечаются нарушения слуха. Фенотип, свойственный этому синдрому, развивается по причине мутаций в гене *FGFR2* (HSA10q26), кодирующем рецептор 2 фактора роста фибробластов.



Рис. 124. Синдром Крузона*

Синдром Тричера-Коллинза – аутосомно-доминантное заболевание с характерными изменениями лицевого черепа (небольшими размерами рта, подбородка, ушей) косоглазием и колобомой век (рис. 125). Характерны аномалии наружного слухового прохода и тугоухость. Этиологической причиной являются мутации в гене *TCOF1* (HSA5q31.3-q33.3), который кодирует ядерный белок с LIS1-гомологичным доменом.

* URL: http://childface.ru/rus/content/36/diagnosticheskaya_baza.html



Рис. 125. Синдром Тричера-Коллинза*

Синдром Альпорта – сочетание наследственного нефрита и глухоты (рис. 126). Симптоматика со стороны выделительной системы появляется в 5–10 лет. Постепенная потеря слуха обычно начинается раньше. Вначале это нейросенсорное снижение слуха высоких тонов, затем – низких, переходящее из звукопроводящей в звуковоспринимающую тугоухость. Иногда наблюдается миастения, потеря памяти и интеллекта. Сцепленная с полом рецессивная форма этого синдрома вызвана мутациями в гене α -5 цепи коллагена типа IV – *COL4A5* (HSAxq22.3). Аутосомно-рецессивная форма синдрома Альпорта связана с мутациями в генах *COL4A3* и *COL4A4* (HSA2q36-q37), которые кодируют α -3 и α -4 цепи коллагена типа IV. Генетическая природа аутосомно-доминантной формы пока изучена меньше, но предполагается ее связь с мутациями гена *COL4A3*.

* URL: <http://emedicine.medscape.com/article/946143-overview>

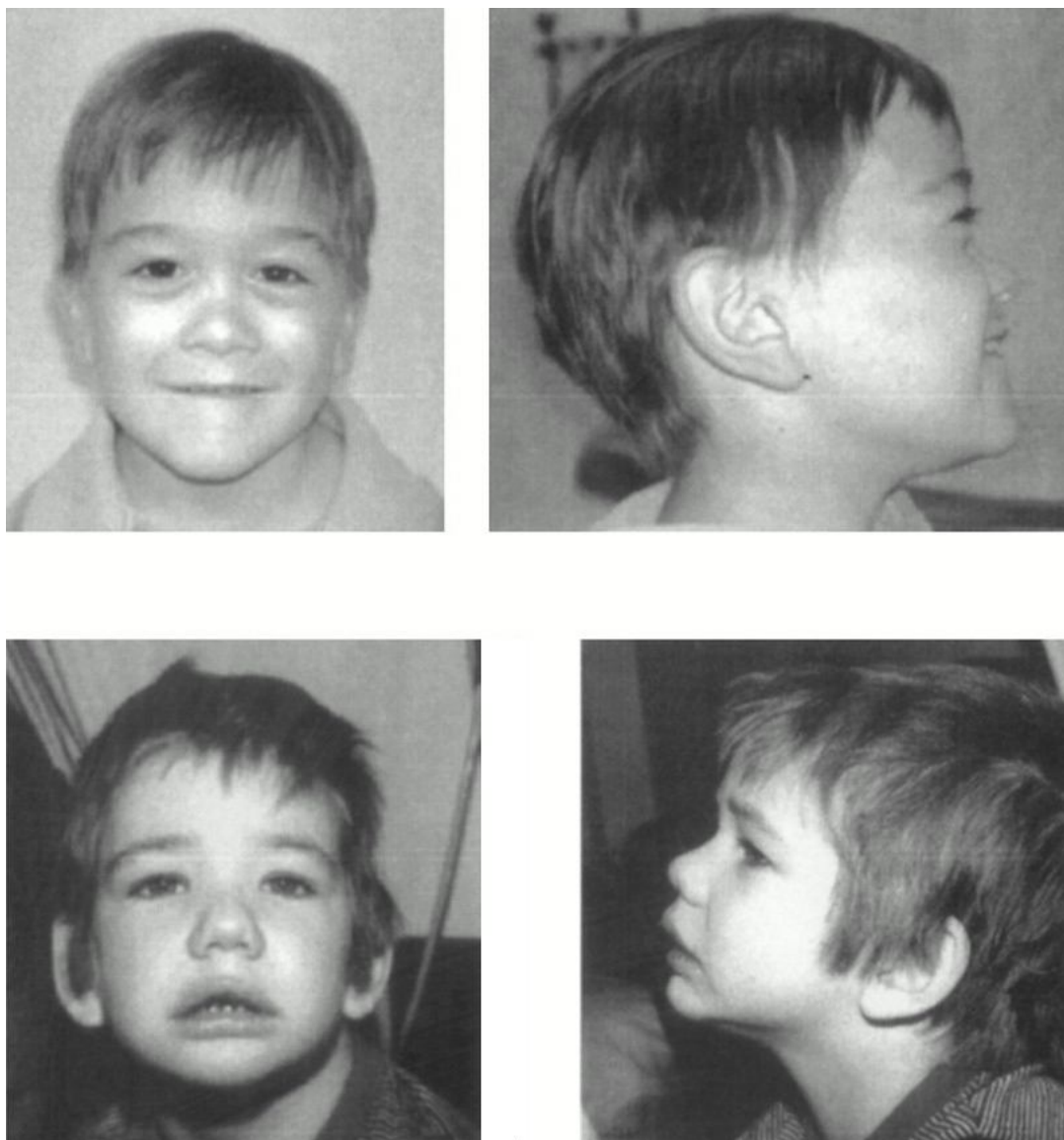


Рис. 126. Синдром Альпорта*

Синдром Пендреда – аутосомно-рецессивное заболевание, проявляющееся потерей слуха и патологиями щитовидной железы – узловым зобом и гипотериозом. Для детей с этим заболеванием характерна прогрессирующая потеря слуха, которая начинается обычно в возрасте до трех лет, замедленный рост костей, диспропорции скелета – большой череп, относительно короткие конечности (рис. 127). Генетической основой заболевания являются мутации в гене *PDS* (HSA7q31), который кодирует пендрин – фермент, присутствующий в улитке внутреннего уха, щитовидной железе и почках.

* URL: <http://jmg.bmj.com/content/39/5/359/F1.large.jpg>



*Рис. 127. Синдром Пендред. Девочке 6 лет. Длина тела 92 см (соответствует 3-летнему возрасту)**

Синдром Ричардса-Рандля – аутосомно-рецессивное заболевание, проявляющееся в атаксии, гипогонадизме и нейросенсорной глухоте. У больных развивается глубокое слабоумие, прогрессирующие мышечные атрофии, наблюдается гипоплазия половых желез, недоразвитие вторичных половых признаков, кетоацидурия, прогрессирующая нейросенсорная тугоухость с раннего детства. Молекулярно-генетические основы этого заболевания остаются неизвестными.

* URL: http://www.medico.ru/medatlas/post/1115312770_01_168_1.jpg

Синдром Жервелла и Ланге-Нильсена – аутосомно-рецессивное заболевание, которое характеризуется врожденной глухотой и нарушением ритма сердца – удлинением интервала QT, отражающего процессы электрического возбуждения и восстановления сердечной мышцы. Часто у больных отмечаются множественные пороки сердца, имеется высокий риск синкопе и внезапной смерти. Клинический полиморфизм, проявляющийся в широком варьировании тяжести проявления определяется различными мутациями в гене *KCNQ1* (HSA11q15.5), который кодирует один из белков калиевых каналов.

Синдром множественных лентиго (синдром леопарда) – аутосомно-доминантное заболевание, минимальные диагностические признаки которого: множественные лентиго (пигментные пятна размером 1–5 мм более темные, чем веснушки), стеноз легочной артерии, умеренный гипертелоризм, аномалии гениталий, глухота (рис. 128). Этиологической причиной являются мутации в гене *PTPN1* (HSA12q24.1), кодирующем протеин-тирозин-фосфатазу нерецепторного типа 1.



Рис. 128. Синдром множественных лентиго*

* URL:

http://www.gfmer.ch/genetic_diseases_v2/gendis_detail_list.php?offset=15&cat3=177

Синдром Ваарденбурга – наследственное заболевание, имеющее следующие признаки: телекант (латеральное смещение внутреннего угла глаза), гетерохромия радужной оболочки, седая прядь над лбом и врожденная глухота (рис. 129). Глухота вызвана нарушениями спирального (кортиева) органа с атрофическими изменениями в спинальном узле и слуховом нерве. Лечение глухоты при этом синдроме неэффективно. Синдром Ваарденбурга типов 1 и 3 вызван доминантными мутациями в гене *PAX3* (HSA2q35), который кодирует транскрипционный фактор семейства PAX. Пенетрантность этих мутаций неполная, экспрессивность варьирует.

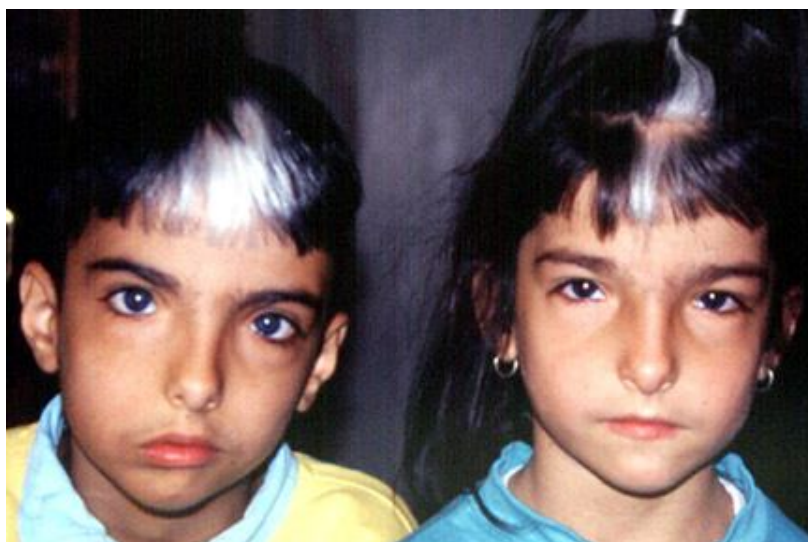


Рис. 129. Синдром Ваарденбурга*

11.6. Генетически обусловленные формы детской слепоты и слабовидения

Слепота и слабовидение наблюдаются при *синдромах Марфана* (разд. 9.3), *Альпорта*, *Крузона*, *Ушера* (разд. 11.5), о которых речь шла выше.

Синдром Ригера (открытоугольная ювенильная глаукома) – аутосомно-доминантное заболевание, которое проявляется в повышении внутриглазного давления, развитии оптической нейропатии с последующей атрофией головки зрительного нерва и возникновением дефектов поля зрения. Для больных характерна щелевидная деформация зрачка, эктопия хрусталика, колобома сосудистой оболочки глаза, телекант, аномалии

* URL: <http://emedicine.medscape.com/article/950277-overview>

зубов (рис. 130). Этиологической причиной этого генетически гетерогенного заболевания могут быть мутации в генах *PITX2* (HSA4q25-q26), *FOXC1* (HSA6p25) и делеция района HSA13q24.

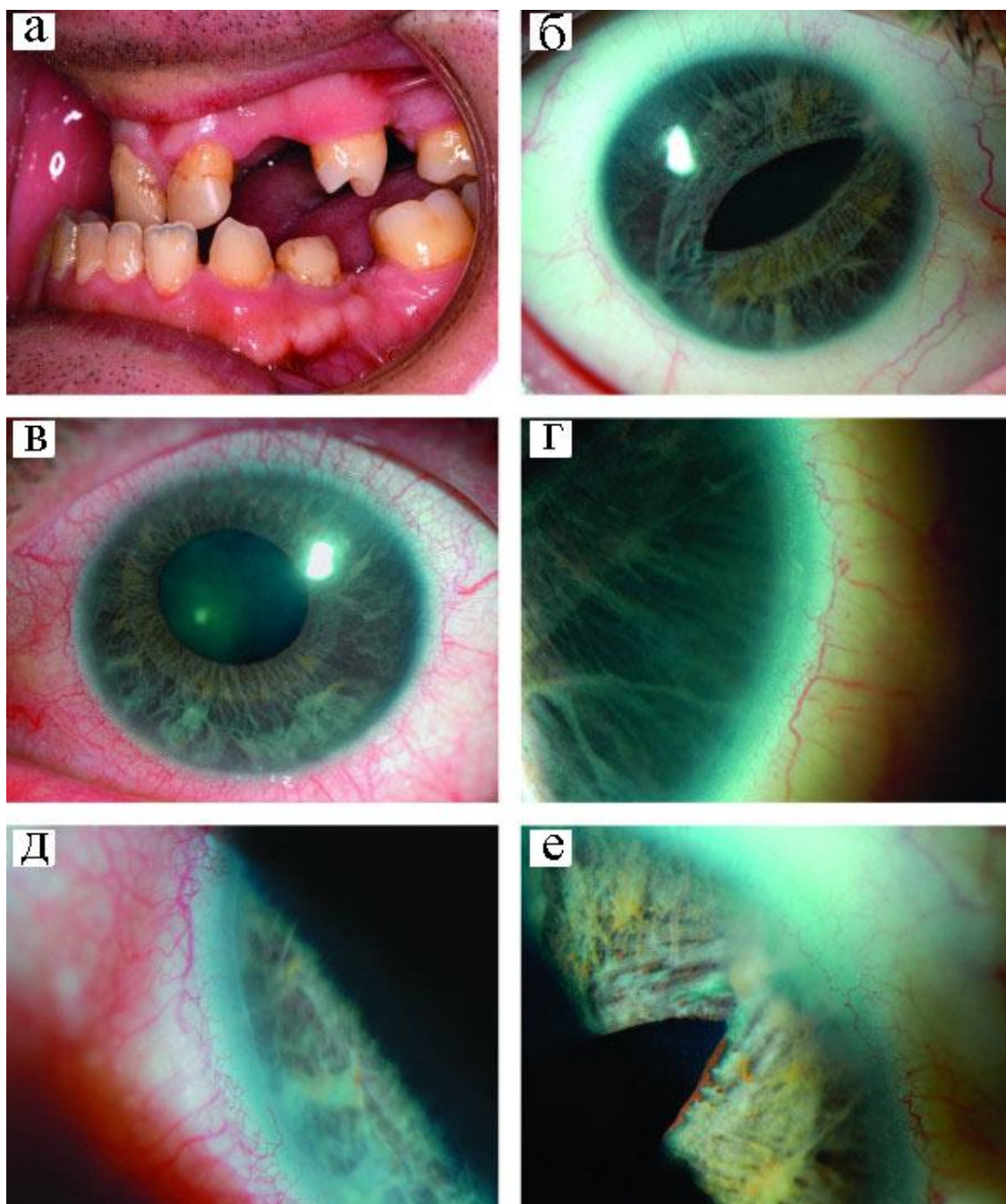


Рис. 130. Синдром Ригера: А – микродонтия и гиподонтия;
 Б – щелевидный зрачок и атрофия радужной оболочки правого глаза;
 В – смещение зрачка с атрофией радужной оболочки левого глаза;
 Г – задний эмбриотоксон правого глаза; Д – задний эмбриотоксон левого глаза;
 Е – периферическая предняя синехия правого глаза*

* URL: <http://www.casesjournal.com/content/1/1/299>

Синдром Альстрема характеризуется пигментной дегенерацией сетчатки, ожирением, сахарным диабетом, дилатационной кардиомиопатией, нефропатией и прогрессирующей нейросенсорной глухотой (рис. 131). Дети при рождении имеют нормальную массу тела, но к концу первого года жизни появляется ожирение. У больных развивается нистагм (дрожание глазных яблок), прогрессирует дистрофия нейроэпителия с атрофией и пигментной инфильтрацией внутренних пластов сетчатки. К семи годам часто происходит полная потеря зрения. Для заболевания характерен клинический полиморфизм, который наблюдается даже у сибсов. Мутации в гене *ALMS1* (HSA2p13), продукт которого пока не охарактеризован, являются причиной этого заболевания.



Рис. 131. Синдром Альстрема*

Синдром Ленца – сцепленное с полом рецессивное заболевание, которое проявляется в нарушении развития глаза (микрофтальмия или анофтальмия), связанных со снижением остроты зрения или слепотой. Для заболевания также характерны аномалии развития ушей, зубов, скелета, выделительной и половой систем (рис. 132). Известна локализация гена, мута-

* URL: <http://img.bmj.com/content/42/2/e10.extract>

ция которого приводит к этому заболеванию, в районе HSA Xq27-q28. Кроме синдрома Ленца описано около десятка форм изолированной и синдромной микрофтальмии с аутосомно-доминантным, аутосомно-рецессивным и сцепленным с полом наследованием.

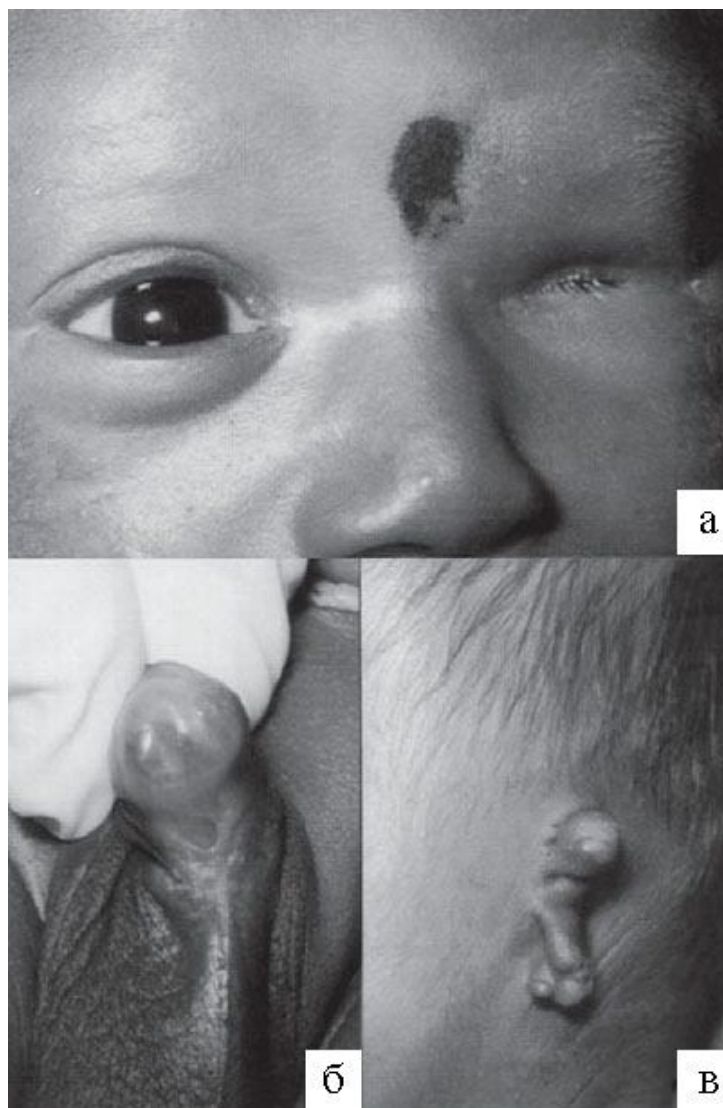


Рис. 132. Синдром Ленца: А – микрофтальмия, Б – односторонний крипторхизм; В – микротия*

Наследственные катаракты – группа заболеваний, связанных с помутнением хрусталика глаза и вызывающих различные степени расстройства зрения. Описано 14 изолированных форм этого заболевания с аутосомно-доминантным, аутосомно-

* URL: http://www.gfmer.ch/genetic_diseases_v2/gendis_detail_list.php?cat3=1883

рецессивным и сцепленным с полом типами наследования. Кроме того, катаракта в качестве симптома может входить во многие наследственные патологические состояния.

Синдром Апера (Аперта) – заболевание с аутосомно-доминантным типом наследования, которое характеризуется синостозом (срастанием) венечных швов, плоским лбом, гипертелоризмом, антимонголоидным разрезом глаз, плоскими глазными впадинами, запавшей переносицей, полным сращением II-V пальцев кистей и стоп, атрофией зрительного нерва (рис. 133). Больные отстают в умственном и физическом развитии. Молекулярно-генетической основой заболевания являются две мутации в экзоне 7 гена *FGFR2* (HSA10q26), который кодирует рецептор 2 факторов роста фибробластов.



Рис. 133. Синдром Апера*

* URL: <http://www.examiner.com/special-education-in-los-angeles/apert-syndrome-information-and-activities-for-early-childhood>

Синдром Маршалла – аутосомно-доминантное заболевание, характеризующееся дисплазией лица (нос курносый, седловидной формы), гипоплазией средней части лица, которая создает впечатление лица бульдога (рис. 134), гиперплазией надглазничной области, аномалиями зубов (адентией, гиподонтией, удвоением зубов, микродонтией), аномалиями глаз – врожденной близорукостью и быстро прогрессирующей катарактой. У больных наблюдается врожденная, часто прогрессирующая односторонняя или двусторонняя тугоухость, которая позже нередко переходит в полную глухоту. Этиологической причиной заболевания являются мутации в гене *COL11A1* (HSA1q21), который кодирует α -1 цепь коллагена типа XI.



Рис. 134. Синдром Маршалла*

Синдром Дюэйна – аутосомно-доминантное заболевание, для которого характерны односторонняя слабость латеральной прямой мышцы глаза (уменьшение или отсутствие способности глаза к отведению, ограничено приведение и слабая конвергенция, ретракция глазного яблока при приведении) с сужением глазной щели во время приведения и расширением ее во время отведения (рис. 135). Иногда у больных наблюдаются аномалии развития лица, зубов, ушей.

* URL: http://www.gfmer.ch/genetic_diseases_v2/gendis_detail_list.php?cat3=703

Для этого заболевания характерна генетическая гетерогенность – синдромы Дюэйна I и II типов вызваны мутациями локуса *DURS1* (HSA8q13) и гена *CHN1* (HSA2q31), который кодирует α -1 химерин.



Рис. 135. Синдром Дюэйна*

* URL: <http://emedicine.medscape.com/article/1198559-overview>

Наследственный дальтонизм – генетически обусловленная неспособность различать один или несколько цветов. Полное отсутствие цветового зрения – достаточно редкое явление. Наиболее часто встречается *проналопия* – дефект рецепторов, воспринимающих свет в красной области спектра. Это заболевание вызвано мутациями в гене *OPN1LW* (HSA Xq28), который кодирует чувствительный к свету длинных волн опсин 1. Другие мутации того же гена приводят к развитию *дейтеранопии* – заболевания, при котором смешиваются красный и зеленый цвета.

Контрольные вопросы и задания

1. Выберите правильный ответ:
Дисплазия соединительной ткани как правило связана с дефектами...
 - а) коллагена
 - б) гликогена
 - в) гемоглобина
2. Для каких заболеваний характерны одновременно нарушения зрения и слуха?
3. Есть ли связь между слабоумием и криминальным поведением? Если есть, при каких заболеваниях?
4. Существуют ли географические закономерности предрасположенности к алкоголизму?
5. Для каких синдромов показано влияние геномного импринтинга?

Глава 12. Современные подходы к лечению и профилактике наследственных заболеваний

12.1. Принципы генотерапии

Лечение наследственных заболеваний может быть четырех типов:

- симптоматическое – устранение или смягчение симптомов. Применяется практически при всех наследственных патологиях, в некоторых случаях является единственно возможным;
- хирургическое – удаление, коррекция или трансплантация органов и тканей;
- патогенетическое – врачебное вмешательство в патогенез. Понимание молекулярно-генетических основ заболевания и особенностей протекания биохимических процессов позволяет во многих случаях корректировать развитие патологии на уровне ферментов или субстратов, либо замещать недостающих белковый продукт;
- этиологическое – устранение причины заболевания. Возможно при помощи генной терапии, которая заключается в замене мутантного участка ДНК на нормальный.

Генная терапия (генотерапия) — совместное применение методов генной инженерии и медицинских подходов с целью внесения изменений в геном соматических клеток человека для лечения заболеваний. Методы генной терапии появились в результате развития техники рекомбинантной ДНК (разд. 7.2–7.6). Широкое применение генотерапии в клинической практике началось в 1993 г., когда было проведено лечение пациентов, страдающих тяжелым комбинированным иммунодефицитным синдромом (SCID). У больных детей извлекли Т-лимфоциты, трансформировали ретровирусным вектором, введя нормальный ген аденозиндезаминазы и вернули клетки в организм. Такую процедуру было необходимо повторять каждые четыре года. Более эффективной оказалась аналогичная трансформация стволовых клеток костного мозга. Позднее были опубликованы данные о полном излечении 8-летнего мальчика, страдающего этим заболеванием. В настоящее время около четверти детей, страдающих SCID, лечат при помощи генотерапии.

Для лечения муковисцероза (разд. 9.3) неповрежденную копию гена *CFTR*, включенную в аденовирусный вектор или липосому, вводят в форме аэрозоля в дыхательные пути больного.

Введение нормальной последовательности гена *DMD* при помощи аденовирусного вектора в мышечные волокна больных миодистрофией Дюшенна (разд. 11.4) позволяет добиться временного терапевтического эффекта.

В настоящее время около 400 проектов по генотерапии находятся на разных стадиях клинических испытаний.

Используют два основных подхода, различающиеся природой клеток-мишеней:

- фетальная генотерапия, т. е. введение ДНК в зиготу или эмбрион на ранней стадии развития. В случае успеха введенная последовательность попадает во все клетки реципиента, включая половые, что обеспечивает передачу следующему поколению;
- соматическая генотерапия, при которой генетический материал вводят только в соматические клетки.

Стандартная схема коррекции наследственного дефекта при помощи генотерапии начинается с создания экспрессирующейся генетической конструкции, содержащей кодирующую и регуляторную части гена. Затем решается проблема вектора, обеспечивающего эффективную, а по возможности и адресную доставку гена в клетки-мишени. Затем проводится трансфекция (перенос полученной конструкции) в клетки-мишени, оценивается эффективность трансфекции, степень регистрируемости первичного биохимического дефекта в условиях клеточных культур (*in vitro*) и, что особенно важно, *in vivo* на животных – биологических моделях. Только после этого переходят к клиническим испытаниям.

В лечении онкологических и некоторых других заболеваний большие надежды возлагают на использование малой интерферирующей РНК (разд. 6.1), которая может подавлять синтез определенных белков и приводить соответствующую молекулу мРНК к деградации.

12.2. Медико-генетическое консультирование

Принято выделять три вида профилактики наследственной патологии:

- первичная профилактика – предупреждение зачатия больного ребенка. При этом учитывается возраст матери, гетерозиготное носительство рецессивных патологий, кровность брака;
- вторичная профилактика – рекомендация по прерыванию беременности в случае диагностированной пренатальной патологии или при высоком риске появления наследственного заболевания у плода;
- третичная профилактика – коррекция наследственных патологических состояний на уровне фенотипа.

В задачи медико-генетических консультаций входит диагностика наследственных заболеваний, определение генетического риска рождения больного ребенка, консультирование семейных пар по вопросам профилактики и лечения наследственных заболеваний. Основы лабораторной диагностики и расчета генетического риска изложены в гл. 10.

Основания для направления семейных пар в медико-генетическую консультацию:

- установленная или подозреваемая патология в семье (данные просеивающей лабораторной диагностики, рождение ребенка с наследственной патологией, задержка физического развития или умственная отсталость у ребенка, повторные спонтанные аборты, выкидыши, мертворождения);
- возраст матери старше 35 лет;
- кровнородственные браки;
- воздействие тератогенов (веществ, вызывающих врожденные аномалии) в первом триместре беременности;
- неблагоприятное протекание беременности.

Даже при отсутствии приведенных выше показаний молодым супругам рекомендуется обратиться в медико-генетическую консультацию при планировании деторождения.

В штате медико-генетической консультации должны быть специалисты – врач-генетик, цитогенетик и генетик-биохимик. Для составления заключения используют следующие методы: клинико-генеалогический, цитогенетический, молекулярно-генетический и неспецифические методы лабораторной диагностики в зависимости от характера наследственной патологии. На основе заключения врач-генетик проводит собеседование с супругами, в котором информирует их о возможных последствиях беременности и дает рекомендации.

Контрольные вопросы и задания

1. Какие подходы применяются к лечению практически всех наследственных заболеваний?
2. Входит ли третичная профилактика наследственных заболеваний в сферу деятельности медико-генетических консультаций?
3. Есть ли необходимость практически здоровым молодоженам старше 35 лет обращаться в медико-генетическую консультацию?

Предметный указатель

30 нм фибрилла – 5.3
BLAST – 8.4
C-бендинг – 5.4
G-бендинг – 5.4
Mapviewer – 8.4
N-бендинг – 5.4
Pubmed – 8.4
QTL – 9.3
Q-бендинг – 5.4
R-бендинг – 5.4
β-талассемия – 9.3
Аберрации хромосом – 5.9
Акроцентрики – 5.1
Алалия – 11.1
Алкаптонурия – 9.3
Аллель – 2.1
Альтернативный сплайсинг – 6.4
Амплификация 5.9
Анафаза – 5.2
Андрогенитальный синдром – 9.3
Анеуплоидия – 5.8
Антикодон – 6.5
Аутосомно-доминантный тип наследования – 2.4
Аутосомное сцепление – 2.7
Аутосомно-рецессивный тип наследования – 2.4
Аутосомный, ограниченный полом тип наследования – 2.4
Ахондроплазия – 11.4
Ацентрический фрагмент – 5.9
Биоинформатика – 7.8
Блот-гибридизация по Саузерну – 7.3
Болезнь Гирке – 9.3
Болезнь Гоше – 9.3
Болезнь Коновалова-Вильсона – 9.3
Болезнь Ниманна-Пика – 9.3
Вербальная диспраксия – 11.1
Возвратное скрещивание – 2.1

Галактоземия – 9.3
Гамета – 5.2
Гаплоидное число хромосом – 5.2
Гемизигота – 2.1
Гемоглобинопатии – 9.3
Генеалогическое древо – 2.3
Генеративные (половые) клетки – 5.2
Генетическая гетерогенность – 9.3
Генетический груз – гл. 3
Генетический риск – 10.2
Генная конверсия – 6.8
Генные болезни – 9.3
Геномика – 7.1
Геномная база данных – 8.4
Геномные библиотеки – 7.4
Геномный фингерпринтинг – 7.7
Генотерапия – 12.1
Гены-кандидаты 9.3
Гетерозигота – 2.1
Гетерозиготное носительство – 10.2
Гетерохроматин – 5.4
Гибридизация *in situ* – 5.5
Гибридизация нуклеиновых кислот – 7.3
Гибриды – 2.1
Гираза – 6.2
Гистоны – 5.3
Глазо-кожный альбинизм первого типа – 9.3
Голандрический тип наследования – 2.4
Гомоцистинурия – 11.2
Гридированные геномные библиотеки – 7.4
Группа сцепления – 2.7
Дейтеранопии – 11.6
Делеция – 5.9
Дефишенси – 5.9
Диагностика хромосомных болезней – 10.1
Дигенные различия – 2.5
Дигибридное скрещивание – 2.5
Диплоидное число хромосом – 5.2

Дислексия – 11.1
Дисперсные повторы – 8.1
Дисплазия соединительной ткани (ДСТ) – 11.4
Дистрофия Дюшенна – 11.4
Дифференциальное окрашивание – 5.4
Дицентрическая хромосома – 5.9
Длинные интерсперсные повторы (LINE) – 8.1
ДНК – 6.1
ДНК-полимераза – 6.2
Доминантный аллель – 2.1
Дот-блот-гибридизация – 7.3
Дрейф генов – гл. 3
Дупликация – 5.9
Закон Харди-Вайнберга – гл. 3
Изохоры – 8.2
Изохромосома – 5.9
Инверсия – 5.9
Инвертированный повтор – 8.1
Индивидуальная терапия – 9.3
Инсерция – 5.9
Интерфаза – 5.2
Интрон – 6.4
Искусственные хромосомы бактерий (BAC) – 7.4
Искусственные хромосомы дрожжей (yacs) – 7.4
Искусственные хромосомы фага P1 (PAC) – 7.4
Истинная микроцефалия – 11.2
Клонирование нуклеиновых кислот – 7.2
Клоны – 7.2
Кодоминирование – 2.2
Колхицин – 5.2
Кольцевая хромосома – 5.9
Комплементарная ДНК (кднк) – 7.2
Комплементарность – 2.6
Комплементарность оснований – 6.1
Конкордантность – гл. 4
Консолидированные повторы – 8.1
Контиг – 7.7
Копаралог – 8.3

Короткие интерсперсные повторы (SINE) – 8.1
Космиды – 7.4
Криминальное поведение – 11.3
Кроссоверные гаметы – 2.7
Кумулятивная полимерия – 2.6
Кэпирование – 6.4
Лигаза – 6.2
Малая интерферирующая РНК – 6.1
Малая ядерная РНК – 6.1
Медико-генетическое консультирование – 12.2
Межаллельная комплиментация – 2.2
Мейоз – 5.2
Метафаза – 5.2
Метафазный анализ – 5.2
Метацентрики – 5.1
Метод дробовика – 7.7
Микросателлиты – 8.1
Микротия – 11.5
Микроцитогенетические синдромы – 10.1
Минисателлиты – 8.1
Миотоническая дистрофия – 11.4
Миссенс-мутация – 6.10
Митоз – 5.2
Митохондриальный тип наследования – 2.4
Митохондрии – 5.1
Мобильные генетические элементы (МГЭ) – 6.9
Мозаицизм – 5.8
Молекулярное маркирование – 9.3
Моногибридное скрещивание – 2.1
Мононуклеотидные полиморфные сайты (SNP) – 9.3
Моносомия – 5.8
Муковисцидоз – 9.3
Мукополисахаридозы – 9.3
Мутации – 5.8
Наследственная патология – 9.1
Наследственные катаракты – 11.6
Наследственный дальтонизм – 11.6
Наследственный сфероцитоз – 9.3

Некумулятивная полимерия – 2.6
Непереносимость лактозы – 9.3
Неполное доминирование – 2.2
Несовершенный остеогенез (НО) – 11.4
Нозерн блот-гибридизация – 7.3
Нонсенс-кодон – 6.5
Нонсенс-мутация – 6.10
Нуклеиновые кислоты – 6.1
Нуклеонема – 5.3
Нуклеосомы – 5.3
Нуклеотиды – 6.1
Обтурационная гидроцефалия – 11.2
Однояйцовые (монозиготные) близнецы – гл. 4
Оогенез – 5.2
Ортология – 8.3
Паралогия – 8.3
Паралогон – 8.3
Парацентрическая инверсия – 5.9
Патогенетическое лечение – 12.1
Патология – 9.1
Пенетрантность – 2.1
Перицентрическая инверсия – 5.9
Пигментная ксеродерма – 6.6
Плейотропия – 2.6
Подагра – 9.3
Позиционное клонирование – 9.4
Полигенные различия – 2.5
Полигибридное скрещивание – 2.5
Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – 7.5
Полимерия – 2.6
Полиовуляция – гл. 4
Полипloidия – 5.8
Правило Чаргаффа – 6.1
Предел Хейфлика – 5.6
Предрасположенность к алкоголизму – 11.3
Пренатальная диагностика – 10.1
Пробанд Сибсы полусибсы – 2.3
Прогредиентное течение болезни – 9.1

Промотор – 6.3
Пронатопия – 11.6
Протеомика – 7.1
Профаза – 5.2
Процессинг РНК – 6.4
Прямая репарация – 6.6
Псевдогены – 8.1
Разнояйцовые (дизиготные) близнецы – гл. 4
Ранний детский аутизм – 11.3
Реверсия – 6.10
Редукционное деление – 5.2
Рекомбинационное – 2.7
Рекомбинация – 6.7
Репарация ДНК – 6.6
Репликационная вилка – 6.2
Репликация ДНК – 6.2
Ретротранспозоны с длинными концевыми повторами (LTR) – 8.1
Рецессивный аллель – 2.1
Реципрокная транслокация – 5.9
Реципрокные скрещивания – 2.7
Решетка Пеннета – 2.5
Рибосомная РНК – 6.1
Ринолалия – 11.1
РНК – 6.1
РНК-интерференция – 6.1
РНК-полимераза – 6.3
Робертсоновская транслокация – 5.9
РТ-ПЦР – 7.5
Рутинная окраска – 5.4
Сайленсер – 6.3
Сантиморган – 2.7
Сателлиты – 8.1
Сверхдоминирование – 2.2
Сдвиг рамки считывания – 6.10
Секвенирование ДНК – 7.6
Серповидноклеточная анемия – 9.3
Сестринские хроматидные обмены – 5.2
Сестринские хроматиды – 5.1

Симптоматическое лечение – 12.1
Синдром Альпорта – 11.5
Синдром Альстрема – 11.6
Синдром Ангельмана – 11.2
Синдром Апера – 11.6
Синдром Ваарденбурга – 11.5
Синдром Варкани – 5.8
Синдром Вильсона – 11.2
Синдром Вольфа-Хиршхорна – 5.9
Синдром Дауна – 5.8
Синдром дефицита внимания и гиперактивности (СДВГ) – 11.3
Синдром дополнительной Y-хромосомы – 5.8
Синдром Дюэйна – 11.6
Синдром Жервелла и Ланге – 11.5
Синдром Клайнфельтера – 5.8
Синдром Корнелии де Ланге – 11.2
Синдром кошачьего крика (синдром Лежена) – 5.9
Синдром Крузона – 11.5
Синдром Ленца – 11.6
Синдром Леша-Нихена – 9.3
Синдром ломкой X-хромосомы – 5.9
Синдром Мартина-Белл – 5.9
Синдром Марфана – 9.3
Синдром Маршалла – 11.6
Синдром множественных лентиг – 11.5
Синдром Патау – 5.8
Синдром Пендреда – 11.5
Синдром Прадера-Вилли – 11.2
Синдром Ригера – 11.6
Синдром Ричардса-Рандля – 11.5
Синдром Рубинштейна-Тейби – 11.2
Синдром Санфилиппо – 9.3
Синдром Смита-Магениса – 11.2
Синдром Сотоса – 11.2
Синдром Тричера-Коллинза – 11.5
Синдром тройной X-хромосомы 5.8
Синдром Ушера – 11.5
Синдром Хантера – 9.3

Синдром Хурлера – 9.3
Синдром Шерешевского-Тёрнера – 5.8
Синдром Эдвардса – 5.8
Синдром Элерса-Данлоса – 11.4
Системная биология – 7.8
Соматические клетки – 5.2
Сперматогенез – 5.2
Сплайсинг – 6.4
Сравнительная геномная гибридизация (CGH) – 5.5
Субклонирование – 7.7
Субметацентрики – 5.1
Супрессия – 2.6
Супрессорная мутация – 6.10
Сцепленное с полом доминантное – 2.4
Сцепленное с полом рецессивное наследование – 2.4
Тандемный повтор – 8.1
Т-бендинг – 5.4
Теломера – 5.1
Теломераза – 5.6
Теломерные повторы – 5.6
Телофаза – 5.2
Тельце Барра – 10.1
Тестикулярная феминизация – 9.3
Топоизомераза – 6.3
Точковая мутация – 6.10
Транзиция – 6.10
Трансверсия – 6.10
Транскриптомика – 7.1
Транскрипционный фактор – 6.3
Транскрипция – 6.3
Транслокация – 5.9
Трансляция – 6.5
Транспозоны – 6.9
Транспортная РНК – 6.1
Триплоидия – 5.8
Трисомия – 5.8
Туберозный склероз – 11.2
Умственная отсталость – 12.2

Уникальные последовательности ДНК – 8.1
Фенилкетонурия – 9.3
Фибродисплазия – 9.3
Филадельфийская хромосома – 5.9
Фрагильный сайт – 5.9
Фрагмент Оказаки – 6.2
Хеликаза – 6.2
Химеризм – 7.4
Хроматида – 5.1
Хроматин – 5.3
Хромомеры – 5.3
Хромонема – 5.3
Хромосомный пейнтинг – 5.5
Хромосомы – 5.1
Хронический миелобластный лейкоз (ХМЛ) – 5.9
Хроническое течение болезни 9.1
Центромера – 5.1
Центромерный индекс – 5.1
Шизофрения – 11.3
Эквационное деление – 5.2
Экзон – 6.4
Экспрессивность – 2.1
Эксцизионная репарация – 6.6
Энхансер – 6.3
Эпистаз – 2.6
Этиологическое лечение – 12.1
Эухроматин – 5.4
Эффект бутылочного горлышка – гл. 3
Ядро – 5.1
Ядрышко – 5.1

Для заметок

Учебное издание

Алексей Александрович Сазанов

ОСНОВЫ ГЕНЕТИКИ

Учебное пособие

Редактор *Т. Г. Захарова*
Технический редактор *Н. В. Чернышева*
Оригинал-макет *Н. В. Чернышевой*

Подписано в печать 07.11.11 Формат 60х84 1/16.
Бумага офсетная. Гарнитура Arial. Печать офсетная.
Усл. печ. л. 15. Тираж 500 экз. Заказ № 712

Ленинградский государственный университет имени А.С. Пушкина
196605, Санкт-Петербург, Пушкин, Петербургское шоссе, 10

РТП ЛГУ 197136, Санкт-Петербург, Чкаловский пр., 25а