

УДК 575.822

**Д.В. Леонов, Е.М. Устинов,
В.О. Деревянная, В.М. Кислицкий,
С.К. Самсонова, М.Е. Алаторцева,
А.Н. Маркелова, В.В. Высоцкая,
Т.С. Чурикова, Ю.В. Трофимкина,
А.О. Майорова, С. Е. Лейкам,
Д.В. Антипенко, А.И. Михайловский,
Д.А. Григорьев, П.Е. Бородин,
Е.А. Бородин**

ФГБОУ ВО Амурская ГМА
Минздрава России
г. Благовещенск

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ. ЗНАЧЕНИЕ. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Зарождение во второй половине XX века молекулярной биологии сопровождалось появлением понятий «молекулярная болезнь» и «молекулярная медицина» [5]. Предложенная Джеймсом Уотсоном и Френсисом Криком модель строения молекулы ДНК в виде двойной спирали [7] позволила в должной мере оценить ее биологическую роль. Из модели вытекал принцип матричных синтезов, т.е. синтезов, при которых информация о структуре синтезируемой молекулы закодирована в строении молекулы-матрицы. На матрице молекулы ДНК синтезируется молекула иРНК, которая, в свою очередь, является матрицей для синтезируемых на рибосомах полипептидных цепях белка. Именно белки реализуют генетическую информацию. Поэтому белки рассматривают как реально работающие в клетке «вычислительные машины» [1]. Последовательность считывания генетической информации в направлении ДНК>РНК>белок получила название главной догмы молекулярной биологии. XX-й век завершился реализацией международного научного проекта «Геном человека» результаты которого стали отправной точкой возникновения новейших направлений медицины – генной терапии,

терапевтического клонирования, позволяющего получать генно-инженерными методами стволовые клетки и использовать их в качестве лекарств, таргетной терапии [2].

Совокупность всех генов организма принято называть **геномом**. У человека молекула ДНК содержит 3 миллиарда 200 миллионов пар нуклеотидов. Если развернуть молекулу ДНК в нить, то ее длина составит 187 см. На долю структурных генов, кодирующих более 100 000 индивидуальных белков, приходится лишь 1–3% всей ДНК. Эти гены составляют **экзом**. Около 16% ДНК регулируют экспрессию структурных генов. Роль более 80% ДНК на сегодня не известна. **99,9% генов** одинаковы у всех людей. Индивидуальные особенности определяются всего лишь **0,1% генов**. Относительно небольшое различие в генах любого из нас имеет принципиальное значение, поскольку определяет нашу индивидуальность.

Генетический полиморфизм или генетическое разнообразие – разная вариация генов (poly – много, morpho – форма) [9, 10]. Наличием полиморфизма генов объясняются нарушения структуры и свойств тех белков, которые вырабатываются в организме, т.е. изменения в протеоме.

Генетический полиморфизм может быть обусловлен заменой нуклеотидов, дупликацией, вставками, выпадениями, нуклеотидными повторами. Генетический полиморфизм может носить количественный или качественный характер. Некоторые из полиморфизмов встречаются довольно часто, другие очень редко [4].

Изменения функции при генетическом полиморфизме могут быть:

- выгодными для организма,
- нейтральными или слабо отрицательными,
- отрицательными,
- выгодными в определенной среде и отрицательными – в другой.

На основе анализа генетических полиморфизмов возможно создание **генетического паспорта**, представляющего собой индивидуальную базу ДНК данных, которая отра-

РЕЗЮМЕ

99,9% генов одинаковы у всех людей. Индивидуальные особенности каждого из нас получили название генетического полиморфизма, определяемого всего лишь 0,1% генов и проявляющегося в виде полиморфизма единичного нуклеотида, полиморфизма длины рестрикционных фрагментов, коротких tandemных повторов. Возможность секвенирования индивидуальных геномов вносит индивидуальный подход к лечению и профилактике заболеваний человека и является фундаментальной основой персонализированной медицины, учитывающей особенности геномов отдельных людей, определяющих склонность человека к развитию у него той или иной болезни. На основе анализа генетических полиморфизмов возможно создание генетического паспорта, представляющего собой индивидуальную базу ДНК данных, которая отражает уникальные генетические особенности каждого человека, его предрасположенность к тем или иным наследственным, мультифакторным и другим заболеваниям.

Ключевые слова: генетический полиморфизм, ДНК-диагностика, нейродегенеративные заболевания, гентингтин. DOI 10.22448/AMJ.2017.2.62-67

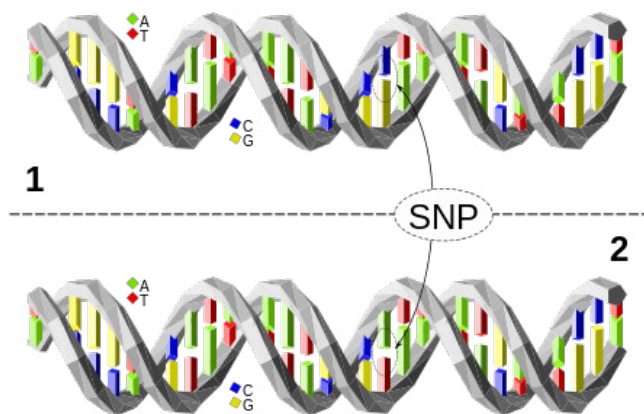


Рисунок 1. Полиморфизм единичного нуклеотида. Однонуклеотидный полиморфизм – отличия последовательности ДНК размером в один нуклеотид (А, Т, G или С) в геноме. Если две последовательности ДНК – ААGССТА и ААGСТТА – отличаются на один нуклеотид, это свидетельствует о существовании двух аллелей: С и Т.

жают уникальные генетические особенности каждого человека, его предрасположенность к тем или иным наследственным, мультифакторным и другим заболеваниям.

Классическим примером полиморфизма генов являются 4 группы крови. При определенных условиях некоторые генетические полиморфизмы могут либо предрасполагать, либо препятствовать проявлению различных заболеваний. Различают следующие основные виды генетического полиморфизма.

Однонуклеотидный полиморфизм (ОНП) – отличия последовательности ДНК размером в один нуклеотид (А, Т, G или С) в геноме представителей одного вида или между гомологичными участками гомологичных хромосом индивида. ОНП возникают в результате точечных мутаций и особенно важны для молекулярной диагностики болезней. Широкий спектр заболеваний – рак, инфекционные, аутоиммунные заболевания, серповидно-клеточная анемия и другие связываются с однонуклеотидным полиморфизмом (рис. 1).

Для выявления генетического полимор-

физма используется **секвенирование ДНК** – определение последовательности нуклеотидов в полинуклеотидной цепи (рис. 2). При полно геномном секвенировании секвенируется вся молекула ДНК, состоящая у человека из 3 млрд 200 млн нуклеотидов. Для решения столь грандиозной задачи созданы методы непрямого секвенирования (методы секвенирования нового поколения). При частичном секвенировании определяется нуклеотидная последовательность выбранных локусов ДНК. В последовательности нуклеотидов ДНК записана вся информация о свойствах организма, передаваемая от родителей потомству, в том числе информация о предрасположенности к тем или иным заболеваниям. Поэтому секвенирование находит применение в клинической лабораторной диагностике. В Амурской областной детской клинической больнице установлен пиросеквенатор, позволяющий выявлять некоторые генетические заболевания, в частности, синдром Жильбера. Метод позволяет дифференцировать гомо- и гетерозиготные формы заболевания.

Полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ) – способ исследования ДНК путем ее разрезания эндонуклеазами и определения размеров образующихся фрагментов (рестриктов) с помощью гель-электрофореза (рис. 3). Анализ разнообразия образующихся рестриктов является важным инструментом в картировании генома, локализации генов, ответственных за генетические заболевания, определения риска заболевания, получения генетических отпечатков и определения родства, судебно-криминалистической экспертизе. Последнее направление получило название **ДНК-дактилоскопия**.

Короткие тандемные повторы – варьирующие участки (локусы) в ядерной и митохондриальной ДНК, состоящие из тандемно повторяющихся мономеров длиной меньше 9 пар оснований (рис. 4), являются широко распространенными молекулярными маркерами в генетических и геномных исследованиях. Уве-

GENETIC POLYMORPHISM. VALUE. METHODS OF RESEARCH

D.V. Leonov, E.M. Ustinov, V.O. Dereviannaya, V.M. Kislitsky, S.K. Samsonova, M.E. Alatortseva, A.N. Markelova, V.V. Vysotskaya, T.S. Churikova, Yu.V. Trofimkina, A.O. Mayorova, S. E. Leikam, D.V. Antipenko, A.I. Mikhailovsky, D.A. Grigoriev, P.E. Borodin, E.A. Borodin
Amur State Medical Academy, Blagoveshchensk

Abstract

99,9% of the genes are the same for all people. The individual characteristics of each of us were called genetic polymorphism, determined only by 0,1% of the genes and manifested in the form of single nucleotide polymorphism, restriction fragment length polymorphism, and short tandem repeats. The possibility of sequencing of individual genomes introduces an individual approach to the treatment and prevention of human diseases and represents the fundamental basis of personalized medicine. The latter takes into account the peculiarities of the genomes of individuals, determining the person's predisposition to develop some diseases. Based on the analysis of genetic polymorphisms, it is possible to create a genetic passport, which is an individual DNA database, reflecting the unique genetic characteristics of each person, his predisposition to certain hereditary, multifactor and other diseases.

Key words: genetic polymorphism, DNA diagnostics, neurodegenerative diseases, gentingtin.

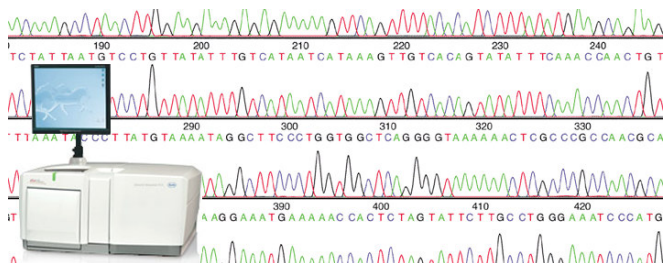


Рисунок 2. Секвенирование. Секвенирование (от англ. sequence – последовательность) – определение первичной аминокислотной или нуклеотидной последовательности биополимеров (белков и нуклеиновых кислот – ДНК и РНК).

личение числа повторяющихся элементов микросателлитов в экзонах или в регуляторных генах связано с развитием неврологических заболеваний [6].

Одним из важнейших белков нервной ткани является хантингтин (Htt). Уникальной особенностью этого белка является наличие рядом с N-концом полипептидной цепи повторяющейся последовательности остатков глутамина. Число глутаминовых повторов в Htt здоровых людей варьирует, но не превышает 35. Развитие хорей Гентингтона является следствием мутации в первом экзоне (EX1) по типу коротких tandemных повторов, приводящей к увеличению числа повторяющихся остатков глутамина, число которых может достигать 250 и более. Время начала заболевания и его тяжесть напрямую зависят от числа повторов [8].

Предполагается, что в мутантном белке mHtt полиглутаминовая область приобретает

токсичную конформацию в виде β -структуры, в результате чего белок агрегирует и выпадает в осадок в виде амилоидных фибрилл. По меньшей мере десять нейродегенеративных заболеваний вызваны полиглутаминовыми экспансиями, включая хорей Гентингтона, спинальную и бульбарную мышечные атрофии и полиглутаминовую спиноцереbellарную атаксию [6]. В связи с изложенным, Htt представляет мишень при разработке новых эффективных лекарственных средств, создаваемых с помощью компьютерного дизайна. Для создания таких средств абсолютно необходимо знание третичной структуры белка (3D-структуры), устанавливаемой традиционно с помощью физико-химических методов (ЯМР-спектроскопия, Rg-структурный анализ, электронная криомикроскопия), требующих дорогостоящего оборудования и поглощающих много времени. На сегодняшний день 3D-структура Htt не исследована. Точнее, установлена только структура начального N-концевого фрагмента в 430 аминокислот (АМК), включающего повтор из 17 остатков глутамина [3]. Для решения изложенной задачи находят применение методы компьютерного моделирования. Суть их проста. В базе данных 3D-структур белков (RCSB PDB и др.) с помощью алгоритма BLAST находят белок-шаблон (template) с установленной физико-химическими методами 3D-структурой, чья АМК-последовательность (первичная структура) максимально совпадает с первичной структурой белка 3D-структуру которого хо-

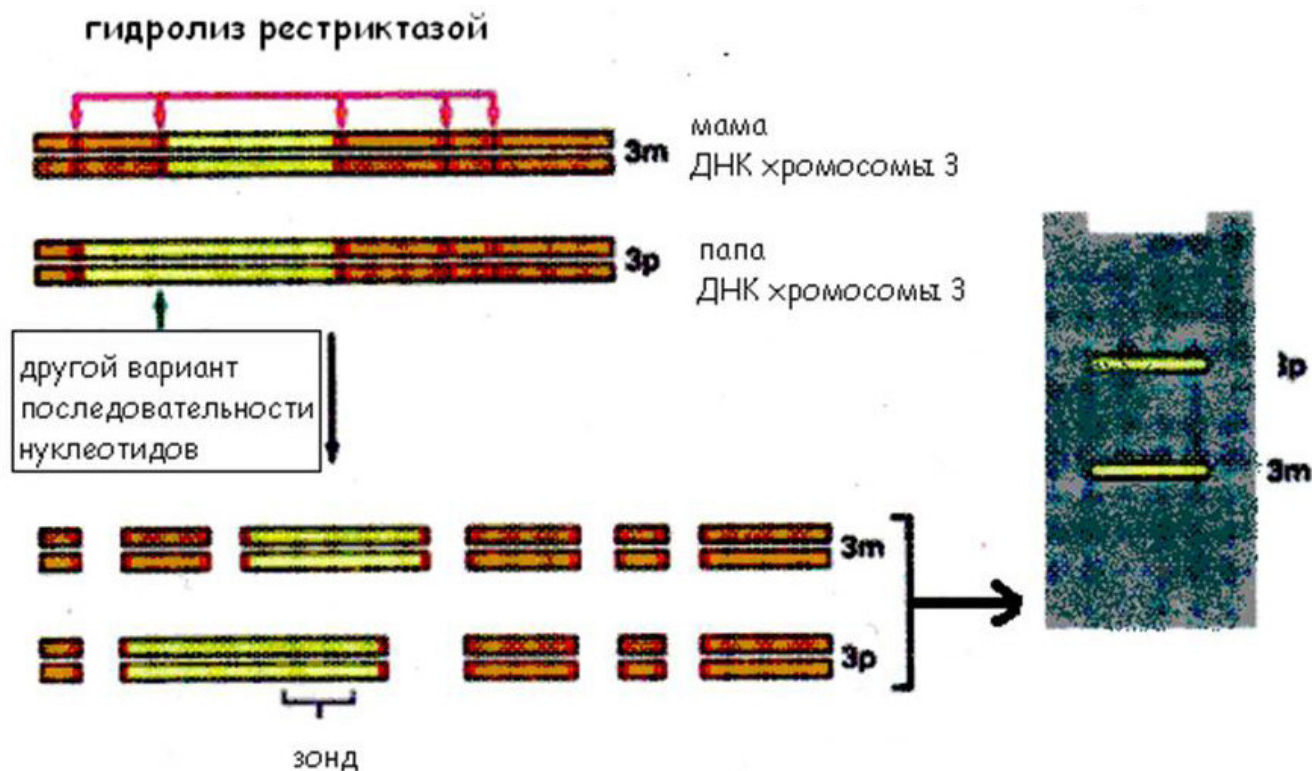


Рисунок 3. Полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ). Полиморфизм длины рестрикционных фрагментов – способ исследования геномной ДНК путем ее разрезания эндонуклеазами и определения размеров образующихся фрагментов (рестриктов) с помощью гель-электрофореза.

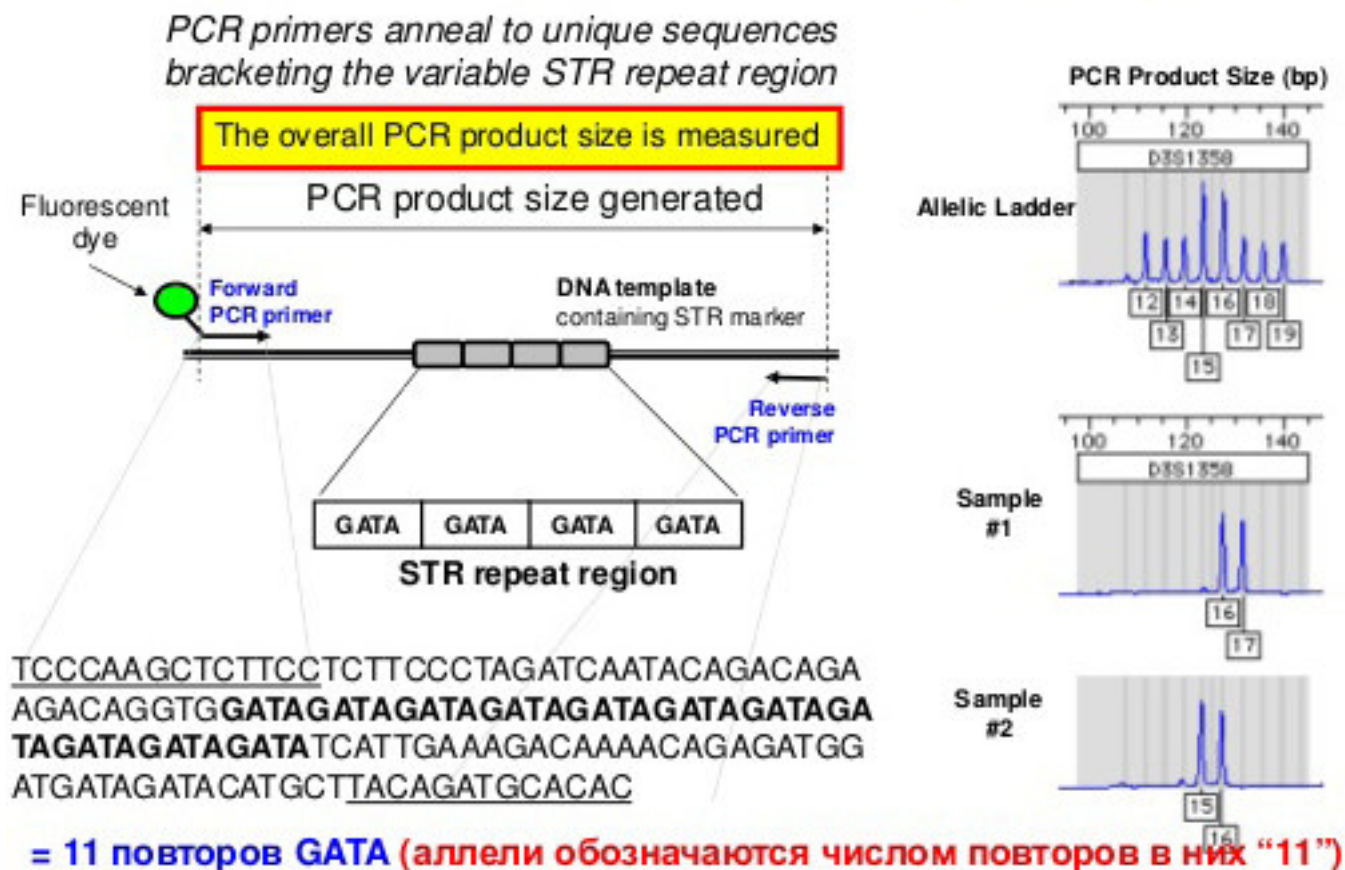


Рисунок 4. Короткие тандемные повторы. Короткие тандемные повторы или микросателлиты – варьирующие участки (локусы) в ядерной и митохондриальной ДНК, состоящие из тандемно повторяющихся мономеров длиной меньше 9 пар оснований, широко распространённые молекулярные маркеры в генетических и геномных исследованиях.

тют смоделировать. В дальнейшем компьютер моделирует 3D-структуру интересующего исследователя белка (query). В случае Htt главной сложностью является уникально большая длина его полипептидной цепи, включающая 3142 АМК. Для такой длинной цепи невозможно найти белки-шаблоны. Для решения проблемы нами предложен подход, заключающийся в моделировании 3D-структур отдельных участков полипептидной цепи Htt с объединением последних в единую молекулу в конечном итоге.

В ходе исследования использовались базы данных **UniProt** и **NCBI Protein** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein> для поиска первичной последовательности Htt в формате FASTA. Первичная последовательность была условно разбита на 11 участков по ~300 АМК (142 АМК в 11 участке) в каждом. Для каждого участка были проведены поиск белка-шаблона с известной третичной структурой по алгоритму **BLAST** и построение на основе шаблона 3D-модели на сервере **SWISS-MODEL** <https://swissmodel.expasy.org/>. Примечательно, что белки-шаблоны для каждого участка относились соответственно к различным группам по своим биологическим свойствам (табл. 1). Следовательно, возможно предположить полифункциональность физиологической роли Htt.

Полученные 11 моделей были загружены в Chimera 1.11.2, где между ними осуществлено создание пептидных связей с образованием 3D-модели Htt (рис. 5). Результаты представлены в формате **.pdb** – файла, доступного для дальнейшего использования в любом программном обеспечении для биоинформатической работы с белками.

Таким образом, возможность секвенирования индивидуальных геномов вносит индивидуальный подход к лечению и профилактике заболеваний человека и является фундаментальной основой персонализированной медицины, учитывающей особенности геномов отдельных людей, определяющих склонность человека к развитию у него той или иной болезни.

Литература

1. Арчаков А.И. Биоинформатика, геномика и протеомика - науки о жизни XXI столетия // Вопросы медицинской биохимии. 2000. Т. 47. 1. С. 2–9.
2. Бородин П.Е., Войцеховский В.В., Бородин Е.А. От молекулярной биологии к молекулярной и персонализированной медицине, медицине XXI века. Амурский медицинский журнал. 2016. № 1 (17). С. 68–73.
3. Kim M.W., Chelliah Y., Kim S.W., Otwinowski Z., Bezprozvanny I. Secondary structure of Huntingtin amino-terminal region. Structure (London, England : 1993). 2009. 17 (9):1205-1212. doi:10.1016/j.str.2009.08.002.
4. Mills R.E., Pittard W.S., Mullaney J.M., Farooq U., Creasy T.H.,

Таблица 1. Сравнительная характеристика участков молекулы хантингтина

Но ме р мо дел и	Участок цепи Htt (АМК)	Участок обрезанного фрагмента, доступный для моделирования	Количество АМК во фрагменте	Название белка- шаблона	PDB ID шаблон а	Степень покрытия шаблона и модели (coverage)	Степень идентичности шаблона и модели (seq. identity)	Score	Группа белка- шаблона в RSCB PDB
1	1-300	94-297	203	GTPase activator-like protein	5HIU	0,65	14,87	0,91	Signalling protein
2	301-600	309-394	85	TOG domain structure from C.elegans Zyg9	2OF3	0,21	18,75	0,31	Structural protein cell cycle
3	601-900	710-875	165	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform	2IAE	9,55	16.46	0,78	Hydrolase
4	901-1200	1157-1184	27	Ribosomal protein eL8	3J7O	0,09	25,93	0,13	Ribosome
5	1201-1500	1208-1260	52	Importin subunit beta-1	3ND2	0,17	9,8	0,24	Transport protein
6	1501-1800	1509-1598	89	Protein STU2	4U3J	0,30	8,99	0,41	Structural protein / Protein binding
7	1801-2100	2001-2044	43	DNA primase	4IM9	0,14	19,51	0,20	Transferase
8	2101-2400	2199-2263	64	Dynein heavy chain 9	2RR7	0,18	21,82	0,27	Motor protein
9	2401-2700	2440-2546	106	Hyaluronoglucosaminidase	2OZN	0,32	14,74	0,44	Toxin
10	2701-3000	2714-2925	211	Putative	4XRI	0,64	11,92	0,89	Transport

- Mahurkar A.A., Kemeza D.M., Strassler D.S., Ponting C.P., Webber C., Devine S.E. (2011). Natural genetic variation caused by small insertions and deletions in the human genome. *Genome Research*. 21 (6): 830–9.
5. Pauling L., Itano H., Singer S.J., Wells I. Sickle Cell Anemia, a Molecular Disease. *Science*, Vol. 110, No. 2865. P. 543–548.
 6. Saudou F., Humbert S. The Biology of Huntingtin. *Neuron*. 2016. 89(5):910-26. DOI: 10.1016/j.neuron.2016.02.003
 7. Watson J., Crick F. (1953). Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 1953, Vol. 171 No 4356, pp. 737–8.
 8. Zoghbi H.Y., Orr H.T.: Glutamine repeats and neurodegeneration. *Annual review of neuroscience*. 2000, 23: 217-247. 10.1146/annurev.neuro.23.1.217.
 9. Biology-Online http://www.biology-online.org/dictionary/Genetic_polymorphism
 10. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Class/MLACourse/Modules/MolBioReview/variation.html>

Статья поступила в редакцию 13.06.2017

Координаты для связи

Леонов Денис Викторович, студент
ФГБОУ ВО Амурская ГМА Минздрава России.
E-mail: den.leo.199@mail.ru

Устинов Егор Михайлович, студент
ФГБОУ ВО Амурская ГМА Минздрава России.
E-mail: egor-24.98.98@mail.ru

Деревянная Валерия Олеговна, студентка
ФГБОУ ВО Амурская ГМА Минздрава России.
E-mail: derevuannaya@bk.ru

Кислицкий Владислав Михайлович, студент
ФГБОУ ВО Амурская ГМА Минздрава России.
E-mail: vlad_kisli@mail.ru

Самсонова Светлана Константиновна, студентка
ФГБОУ ВО Амурская ГМА Минздрава России. E-mail: Winalotoo1@gmail.com

Алаторцева Мария Евгеньевна, студентка
ФГБОУ ВО Амурская ГМА Минздрава России. E-mail: mo.d.n.san@gmail.com

Маркелова Анастасия Николаевна, студентка
ФГБОУ ВО Амурская ГМА Минздрава России.

Высоцкая Валентина Викторовна, студентка
ФГБОУ ВО Амурская ГМА Минздрава России. E-mail: valentinkav2017@mail.ru

Чурикова Татьяна Сергеевна, студентка
ФГБОУ ВО Амурская ГМА Минздрава России. E-mail: churikova@yandex.ru

Трофимкина Юлия Вадимовна, студентка
ФГБОУ ВО Амурская ГМА Минздрава России. E-mail: trofiiim_123@mail.ru

Майорова Алина Олеговна, студентка
ФГБОУ ВО Амурская ГМА Минздрава России. E-mail: alina-maiers@mail.ru

Лейкам Светлана Евгеньевна, студентка
ФГБОУ ВО Амурская ГМА Минздрава России. E-mail: lanaleikam@outlook.com

Антипенко Дарья Вячеславовна, студентка
ФГБОУ ВО Амурская ГМА Минздрава России.

Михайловский Алексей Игоревич, студент
ФГБОУ ВО Амурская ГМА Минздрава России. E-mail: aleks_nordoo@mail.ru

Григорьев Дмитрий Алексеевич, студент

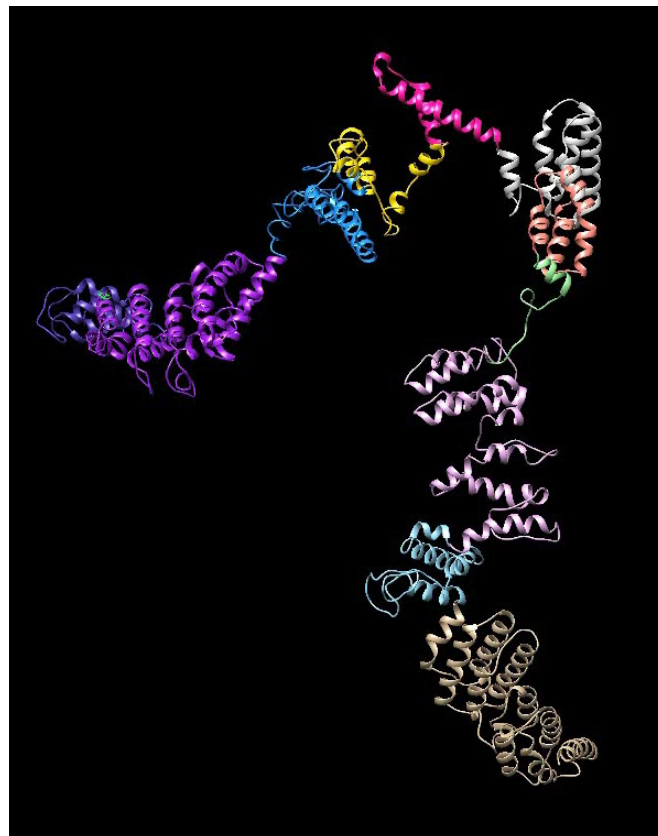


Рисунок 5. Сгенерированная 3D-модель хантингтина. Первичная последовательность хантингтина была условно разбита на 11 участков по 300 АМК в каждом, за исключением 142 АМК в 11 участке. Для каждого участка были построены 3D-модели на сервере SWISS-MODEL <https://swissmodel.expasy.org/>. Полученные 11 моделей были загружены в Chimera 1.11.2, где между ними осуществлено создание пептидных связей с образованием 3D-модели.

ФГБОУ ВО Амурская ГМА Минздрава России. E-mail: klinkova80@mail.ru

Бородин Павел Евгеньевич, студент ФГБОУ ВО Амурская ГМА Минздрава России. E-mail: borodin.agma@gmail.com

Бородин Евгений Александрович, д. м. н., профессор, заведующий кафедрой химии ФГБОУ ВО Амурская ГМА Минздрава России. E-mail: borodin54@mail.ru

Почтовый адрес ФГБОУ ВО Амурская ГМА Минздрава России: 675000, г. Благовещенск Амурской области, ул. Горького, 95. E-mail: agma@mn.ru