

© И. О. Сучкова¹,
Д. М. Шубина¹, Л. К. Сасина¹,
Н. А. Сломинская¹,
В. Б. Васильев¹, Н. Аленина²,
М. Бадер², Е. Л. Паткин¹

¹ ГУ Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины РАМН,
Санкт-Петербург;

² Макс-Дельбрюк Центр Молекулярной медицины,
Берлин, Германия

✿ Проведены компьютерный и молекулярно-генетический анализы минисателлита человека UPS29, локализованного в интроне гена *CENTB5*. Впервые обнаружено 7 аллелей UPS29, содержащих от 6 до 24 повторов. Преобладающим (91,5 %) являлся аллель UPS29 из 17 повторов, частота остальных аллелей колебалась от 0,29 до 4,39 %. Гетерозиготность UPS29 составила 12,3 %. По полученным результатам UPS29 отнесен к классу низкополиморфных негипервариабельных минисателлитов.

✿ **Ключевые слова:** минисателлитная ДНК, гетерозиготность, генетическая изменчивость, внутримолекулярные обмены

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕГИПЕРВАРИАБЕЛЬНОГО ГЦ-БОГАТОГО МИНИСАТЕЛЛИТА ЧЕЛОВЕКА UPS29 ГЕНА *CENTB5*

ВВЕДЕНИЕ

Гипервариабельные минисателлитные локусы вследствие высокого уровня полиморфизма, обусловленного варьированием количества копий повторяющихся единиц, широко используются в качестве генетических маркеров при изучении генома человека, а также в судебно-медицинской экспертизе для идентификации личности. Минисателлиты ассоциированы с такими важными генетическими процессами, как регуляция активности генов, альтернативный сплайсинг, геномный импринтинг, рекомбинация [24]. Имеется много данных, указывающих на их роль в развитии ряда тяжелых нейромышечных и нейродегенеративных наследственных заболеваний человека [5], а также психоневрологических расстройств [2, 18] и многих других патологий, обусловленных их нестабильностью [20, 21]. Но на сегодняшний день молекулярные механизмы влияния некодирующих минисателлитов на выше перечисленные процессы как в норме, так и при различных патологиях далеки от ясности.

Предполагается, что геном человека содержит порядка 6000 минисателлитных локусов, из которых около 4800 должны быть полиморфными, а 2500 — очень полиморфными и только несколько десятков — гипервариабельными. По предварительным подсчетам только 1–3 % VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) являются гипермутабельными [14, 23]. Многие гипервариабельные минисателлиты в своем составе, либо во фланкирующей ДНК имеют горячие точки рекомбинации и, преимущественно, являются ГЦ-богатыми [13, 23, 24]. Также описаны вариабельные АТ-богатые минисателлиты: минисателлит ломкого сайта FRA16B [16, 19] и минисателлит MSY Y-хромосомы [17]. В связи с вышесказанным исследования по идентификации, анализу структуры и функций как можно большего числа некодирующих тандемно повторяющихся последовательностей ДНК, в частности минисателлитных локусов, являются крайне актуальными.

Целью данной работы являлась молекулярно-генетическая характеристика ГЦ-богатого (74 % ГЦ оснований) минисателлита человека UPS29 (University Paris South), идентифицированного Dr. G. Vergnaud (Institute of Genetics and Microbiology, University of Paris) в 1999 году (AL096805), но подробно не охарактеризованного. UPS29 по данным Dr. G. Vergnaud (личное сообщение, 1999) состоит из семнадцати несовершенных 46 пн повторов, общая длина минисателлита составляет 745 пн. UPS29 находится в интроне 13–14 либо интроне 14–15 гена центаурин β5 (*CENTB5*) (GeneID: 116983), в зависимости от варианта транскрипта, состоящего из 22 экзонов либо 23 и 24 экзонов (<http://www.ensembl.org>), соответственно.

Результаты данной работы показали, что ГЦ-богатый минисателлитный локус UPS29 в выборке здоровых волонтеров г. Санкт-Петербурга представлен 7 аллельными вариантами, содержащими 6, 8, 9, 10, 14, 17 и 24 повторяющиеся единицы. При этом для трех аллелей UPS29 с одинаковым числом повторов (состоящих из 17, 9 и 6 повторов) было выявлено несколько вариантов, отличающихся между собой комбинацией повторяющихся единиц и наличием делеций и/или однонуклеотидных полиморфизмов в ДНК, фланкирующей минисателлит. Преобладающим (91,5 %) являлся аллель UPS29 из 17 повторов.

В исследованной выборке гетерозиготность UPS29 составила 12,3 %. По классификации F. Depoeud с соавторами [14] UPS29 может быть отнесен к классу низкополиморфных негипервариабельных минисателлитов (по оценке общей протяженности минисателлита).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объект исследования. Исследования минисателлита UPS29 человека проводились на образцах ДНК 171 человека (109 женщин и 62 мужчин) — добровольцев из города Санкт-Петербурга в возрасте от 15 до 85 лет, не состоящих в родстве и не страдающих какими-либо общими заболеваниями. Средний возраст женщин $51,3 \pm 23,6$, мужчин — $50,4 \pm 25,3$. Дополнительно были проанализированы образцы ДНК 66 волонтеров из 27 семей, состоящих из 2–6 человек.

Выделение геномной ДНК и ПЦР-амплификация. Геномную ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови при помощи стандартного фенол-хлороформного метода. Аллельные варианты минисателлита UPS29 человека выявляли методом ПЦР с использованием двух пар олигонуклеотидных праймеров, которые были подобраны с помощью программы Primer 3.0 (<http://www.cbr.nrc.ca/cgi-bin/primer3-www.cgi>). Одна пара (c1UP3 — *tcataagcttcacatgggcagatggtacctg*; c1UP4 — *gtcagaattccgcgagagccctgacagttg*) (рис. 1, 2a) комплементарна экзону 13 (14) и интрону 13–14 (14–15) гена *CENTB5* человека, содержащего UPS29. Вторая пара (exUP5 — *tcataagcttaggctgactccgagaagctg*; exUP6 — *gtcagaattccgcgagcactcaatgcagagcag*) была подобрана к экзонам 13 (14) и 14 (15) с целью амплификации всей интронной последовательности, где локализован UPS29 (рис. 2a). Праймеры с 5'-концов

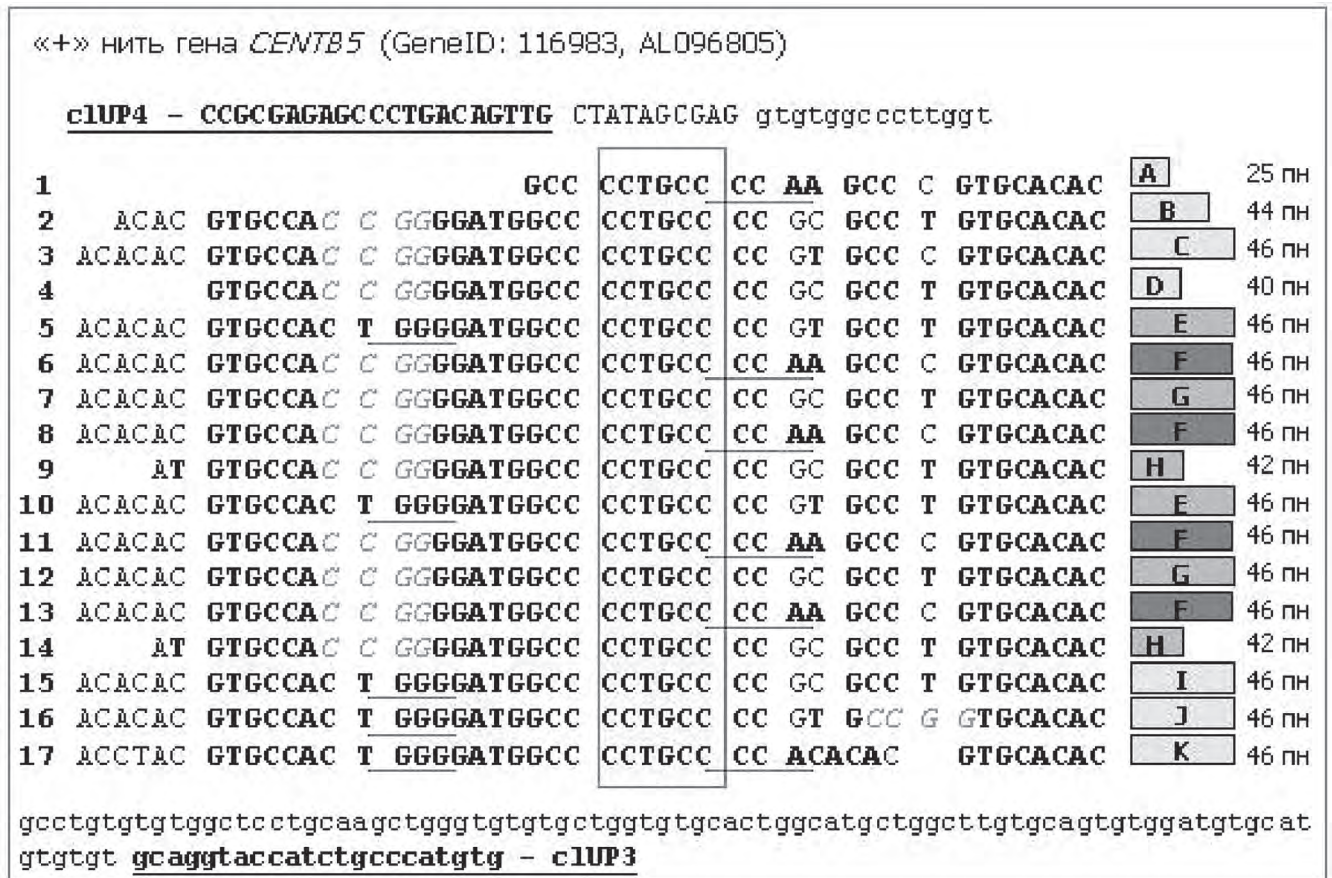


Рис. 1. Фрагмент референтной нуклеотидной последовательности гена *CENTB5* человека (GeneID:116983; AL096805), содержащего минисателлит UPS29. Строчными буквами обозначена нуклеотидная последовательность интрона 13–14 (14–15), в котором локализован UPS29. «1–17» — повторы внутри UPS29. Варианты повторяющихся единиц UPS29 обозначены латинскими буквами внутри прямоугольников серого цвета разной интенсивности (темно-серым отмечен повтор, встречающийся 4 раза, серым и светло-серым — повторы, повторяющиеся дважды и одному разу, соответственно). Цифрами справа от этих прямоугольников указана длина каждой повторяющейся единицы. Сплошной линией подчеркнуты области отжига праймеров c1UP3 и c1UP4. В пунктирном прямоугольнике отмечены сайты, вносящие вклад в нестабильность минисателлитов человека в зародышевой линии [10]. Пунктирной линией подчеркнуты сайты, гомологичные одному из рекомбинационных сигналов переключения классов иммуноглобулинов [25]. Курсивом выделены сайты рестрикции для эндонуклеаз MspI / HpaII

содержат сайты (подчеркнуты) для эндонуклеаз рестрикции HindIII и EcoRI. Ожидаемый размер продуктов амплификации для первой и второй пары праймеров составляет 914 и 1503 пн, соответственно (рис. 2а). ПЦР проводили в термоциклере (Cyclotemp) в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 60 мМ Tris-HCl (рН 8,5 при 25 °С), 25 мМ KCl, 10мМ 2-меркаптоэтанола, 0,1%-й Тритон X-100, 3 мМ MgCl₂, по 320 мкМоль каждого dNTP, 1,25 ед. Taq-полимеразы («Медиген», Новосибирск), по 0,4 мкМоль каждого праймера и 10–15 нг ДНК. Режим амплификации был следующим: один цикл предварительной денатурации при 97 °С в течение 7 минут; 30 циклов, состоящих из денатурации при 96 °С в течение 1 минуты, отжига с праймерами при температуре 57 °С в течение 1 минуты, элонгации при температуре 72 °С в течение 3 минут; заключительный цикл: 57 °С — 1 минута и 72 °С — 8 минут. Продукты амплификации разделяли с помощью нейтрального электрофореза в 6 % ПААГ и окрашивали в 0,1 % AgNO₃. Определение размеров ПЦР амплифицированных фрагментов ДНК осуществляли по внешним стандартам ДНК (ДНК-маркерам: 100 пн и 1000 пн лестницам («Медиген», Новосибирск)) путем компьютерной интерполяции и регрессионного анализа с помощью программы *dzek* (<http://www.tapotili.ru/programs/dzek.zip>).

Рестрикционный анализ. Фрагменты ПЦР-амплификации с праймеров cUP3 и cUP4 обрабатывали эндонуклеазой рестрикции MspI («СибЭнзим», Новосибирск), расщепляющей сайт C↓CGG. Реакцию проводили в 25 мкл реакционной смеси, следуя рекомендациям фирмы-производителя. Продукты рестрикции разделяли с помощью нейтрального электрофореза в 12 % ПААГ и окрашивали в 0,1 % AgNO₃. В качестве контроля эффективности рестрикции использовали ДНК плазмиды pBR322. В дальнейшем pBR322/MspI, помимо 100 пн лестницы, служила в качестве маркера молекулярного веса. Исходная последовательность минисателлита UPS29 содержит 12 сайтов CCGG (рис. 1) и после рестрикции данных ПЦР-продуктов с помощью MspI образуются фрагменты длиной 171 пн, 115 пн, 92 пн, 91 пн, 46 пн, 42 пн и 40 пн (рис. 2б), которые при электрофорезе в 12% ПААГ формируют 4 отдельные зоны: «171», «115», «92», «46».

Секвенирование

Секвенирование продуктов ПЦР-амплификации было проведено фирмами ООО «ОМНИКС» (Санкт-Петербург) (<http://www.omnix.ru>) и ЗАО «СИЛЕКС» (Москва) (<http://www.sileks.com>).

Номенклатура выявленных аллелей UPS29 была введена нами согласно числу повторяющихся единиц. Для аллелей с одинаковым числом копий UPS29, но различа-

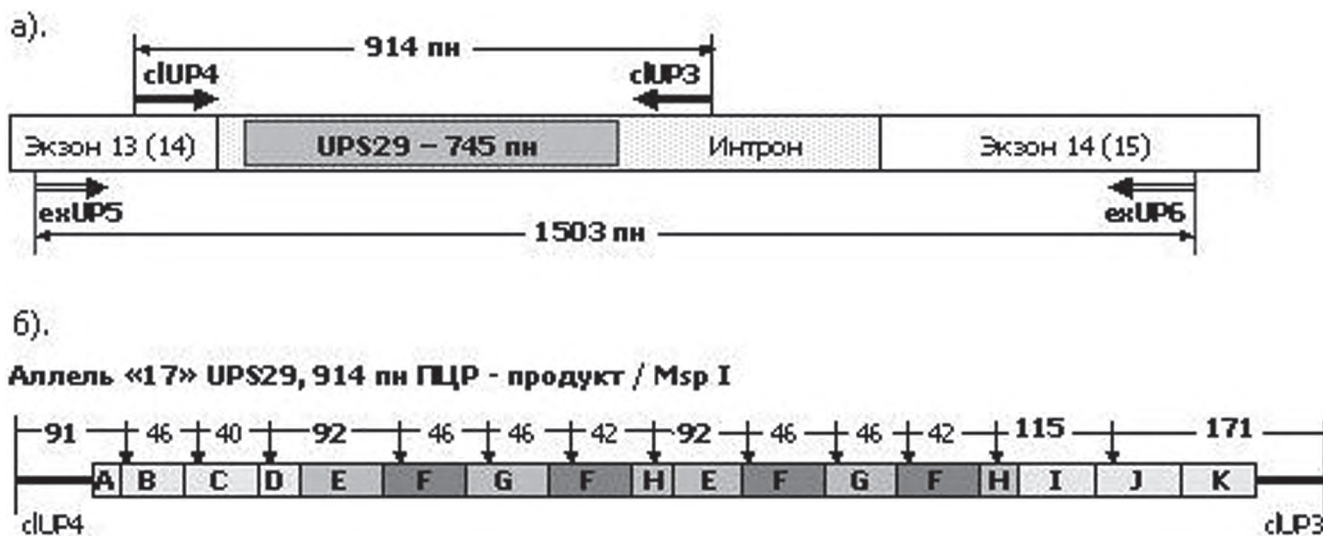


Рис. 2. Схематическое изображение фрагмента референтной нуклеотидной последовательности гена *CENTB5* человека (GeneID:116983; AL096805), содержащего минисателлит UPS29 (серый прямоугольник).

- а) — Области отжига двух пар праймеров cUP3/cUP4 (жирные стрелки) и exUP5/exUP6 (двойные стрелки) и теоретически ожидаемая длина продуктов ПЦР-амплификации с данных праймеров;
- б) — рестрикционная карта ПЦР-продукта с праймеров cUP3 и cUP4 по сайту CCGG эндонуклеаз MspI (HpaII). Стрелками отмечены положения сайтов рестрикции внутри повторяющихся единиц UPS29 (обозначения повторов как на рисунке 1); цифрами обозначены размеры фрагментов рестрикции в парах нуклеотидов (жирным шрифтом указаны более протяженные фрагменты); жирными линиями отмечены участки ДНК, фланкирующие минисателлит UPS29 и содержащие области отжига праймеров cUP3 и cUP4

ющихся по комбинации повторяющихся мотивов и/или по наличию делеций и однонуклеотидных полиморфизмов в ДНК, фланкирующей минисателлит, помимо цифрового обозначения было добавлено буквенное. Такие варианты при статистической обработке данных были объединены в одну аллельную группу, исходя из количества повторяющихся единиц минисателлита.

Статистическая обработка

Для проверки гипотезы о равновесии Харди-Вайнберга использовали критерий χ^2 . Ожидаемую гетерозиготность вычисляли по формуле $H = 1 - (\sum p_i^2)$, где p_i — частоты различных аллелей [1]. Количество возможных генотипов определяли по формуле $K \cdot (K + 1) / 2$, исходя из количества обнаруженных аллелей (K) [1]. Сравнение распределений частот аллелей и генотипов минисателлита UPS29 проводили с учетом поправки на множественность сравнений (с поправкой Бонферрони) с использованием F-критерия Фишера с ϕ -преобразованием, t-критерия Стьюдента, критерия χ^2 и непараметрического критерия Колмогорова λ [3, 6]. Различия считали достоверными при $p < 0,01$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Компьютерный анализ нуклеотидной последовательности минисателлита человека UPS29

С помощью программы Tandem Repeats Finder Program Version 4.00 (<http://tandem.bu.edu/trf/trf.html>) [8] была проведена идентификация повторяющихся единиц минисателлита UPS29. Было выявлено, что UPS29 состоит из 46 пн несовершенных повторов (рис. 1), которые формируют три более протяженных повтора из 226 пн. В UPS29 можно также выделить 31 несовершенный 6 пн повтор (GTGCC). Каждому 46 пн повторяющемуся мотиву нами было присвоено обозначение латинской буквой (рис. 1). В референтной последовательности UPS29 было обнаружено 11 таких вариантов. В каждом 46 пн повторе содержится по одному инвертированному повтору (GGGGATGGCCCC), при этом в четырех повторяющихся единицах есть еще по одному инвертированному повтору (GTGCCTGTGCAC), которые теоретически могут сформировать вторичные структуры ДНК (шпильчатые структуры), которые потенциально могут быть причиной мутаций в UPS29 за счет репликационного проскальзывания [16]. Кроме того, в UPS29 наблюдается нитевая асимметрия по G:C составу. Подобная асимметрия может способствовать образованию Z-формы ДНК, которая, в свою очередь, может приводить к неравной рекомбинации [7, 13, 25].

Поскольку в настоящий момент установлено, что многие гипервариабельные минисателлиты человека преимущественно являются ГЦ-богатыми и в своем составе или во фланкирующей ДНК имеют горячие точки рекомбинации [13, 23], то последовательность

UPS29 была проверена на содержание подобных участков. Оказалось, что UPS29 содержит 11 сайтов, гомологичных на 75 % *Chi*-сайту (CCACCACG) рекомбинации *E.coli* [22]. В центральной части каждого повтора имеется сайт CCTGCC, на 100 % гомологичный сайту, вносящему вклад в нестабильность минисателлитов человека в зародышевой линии [10]. В повторах «G», «I», «J» и «K» минисателлита UPS29 находится по одному сайту TGGG, а в повторах «A», «F» и «K» — комплементарная ему последовательность CCCA (рис. 1). Данный сайт гомологичен одному из рекомбинационных сигналов переключения классов иммуноглобулинов [10]. Девять подобных сайтов имеется в интронной последовательности, фланкирующей UPS29 с 3' стороны (на участке протяженностью в 429 нуклеотидов). Обнаруженные внутри и вне UPS29 сайты, гомологичные вышеперечисленным горячим точкам рекомбинации, потенциально могут являться причиной изменчивости исследуемого минисателлита.

В минисателлите UPS29 с помощью программы MAR-Wiz1.0 (<http://www.futuresoft.org/MAR-Wiz>) был проведен поиск элементов вторичной структуры ДНК, свойственных для MAR-районов (Matrix Attachment Region). Оказалось, что UPS29 имеет шесть сайтов для Торо II, две потенциальные области излома ДНК и несколько участков (GTGCACACACACGTG) с высоким MAR-потенциалом (0,8–1,0), которые теоретически могут связываться с динамическим рибонуклеопротеиновым матриксом ядра. Необходимо подчеркнуть, что практически в каждой повторяющейся единице UPS29 есть микросателлитный (CA)₄₋₅-повтор (рис. 1). Показано, что некоторые районы прикрепления к ядерному матриксу характеризуются CA : TG обогащенностью, причем такие последовательности часто находятся в 3'-нетранслируемых районах ряда генов и могут действовать как сигналы в сайтах рекомбинации (<http://www.futuresoft.org/MAR-Wiz>). Эти микросателлитные участки могут быть причиной репликационного проскальзывания и негомологичного спаривания при репарации двунитевых разрывов ДНК.

Таким образом, вышеперечисленные данные компьютерного анализа дали основание предположить, что UPS29 может оказаться новым представителем класса гипервариабельных минисателлитов. Предположение о возможной гипервариабельности UPS29 было проверено экспериментально.

Молекулярно-генетический анализ UPS29 человека

С целью оценки степени внутрипопуляционного полиморфизма и вариабельности минисателлита UPS29 с помощью ПЦР были проанализированы образцы ДНК 171 человека. На данном этапе работы оценивался полиморфизм UPS29 только по общей длине минисателлита (вариабельность количества копий повторяющихся единиц). В исследованной выборке было

выявлено 10 продуктов ПЦР-амплификации (табл. 1, рис. 3а), 7 из которых были секвенированы и проанализированы с помощью программ Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) и Tandem Repeats Finder Program Version 4.00 (<http://tandem.bu.edu/trf/trf.html>) [8] (табл. 1, рис. 4).

Секвенирование подтвердило, что выявленные продукты ПЦР-амплификации являются аллельными вариантами минисателлита UPS29 (AL096805; GeneID: 116983), представленного в электронной базе GenBank (<http://www.ensembl.org>), которые отличались от него количеством и комбинацией повторяющихся единиц и/или наличием однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) внутри UPS29, либо наличием делеций и SNP во фланкирующей ДНК (рис. 4). По результатам секвенирования был сделан вывод о наличии в исследованной выборке 7 аллелей UPS29, содержащих 6, 8, 9, 10, 14, 17 и 24 повторяющиеся единицы. При этом для трех аллелей UPS29 с одинаковым числом повторов (состоящих из 17, 9 и 6 повторов) было выявлено несколько вариантов, отличающихся между собой комбинацией

повторяющихся единиц и наличием делеций и/или однонуклеотидных полиморфизмов в ДНК, фланкирующей минисателлит. Спектр и частота встречаемости аллельных вариантов UPS29 представлены в таблицах 1 и 2. Следует отметить, что различные варианты аллеля «17» минисателлита UPS29, состоящего из 17 несовершенных повторов, в данной выборке людей являлись преобладающими (91,5 %), тогда как частоты других аллелей были значительно ниже (от 0,29 % до 4,39 %). Все редкие аллели UPS29, в основном, имели меньшее количество повторяющихся единиц по сравнению с аллелью «17», причем среди них наиболее часто (4,39 %) встречались варианты аллеля «9», содержащие по 9 повторов. Был выявлен только один случай, где UPS29 имел, как предполагается, 24 повтора. Из-за недостатка ДНК данный образец не был секвенирован и число повторов определяли, исходя из размера полученного ПЦР-продукта и известной длины повторяющихся единиц UPS29 и ДНК, фланкирующей минисателлит до праймеров.

Достаточно низкие частоты аллельных вариантов UPS29, отличных от аллеля «17», указывают на то,

Таблица 1

Аллельные варианты минисателлита UPS29, выявленные в выборке волонтеров города Санкт-Петербург по результатам ПЦР и секвенирования

Аллель UPS29	Число повторов	Размер ПЦР-продуктов с праймеров cUP3 и cUP4, пн		Размер ПЦР-продуктов с праймеров exUP5 и exUP6, пн	
		По результатам секвенирования	По 100 пн лестнице в 6% ПААГ	Ожидаемые **	По 1000 пн лестнице в 6% ПААГ
24	24 *	—	1200	—	—
17 a	17	895	900	1484	1480
17 b	17	865	850	1454	1450
14	14 *	—	750	—	—
10	10 *	—	550	—	1130
9 a	9	532	520	1121	1110
9 b	9	522	510	1111	1100
8	8	490	500	1079	1000
6 a	6	399	430	988	980
6 b	6	338	380	927	950

Примечание: * — несеквенированные аллели, для которых указано предполагаемое число повторяющихся единиц, определенное по следующей схеме: от размера ПЦР-продукта, оцененного по внешним стандартам молекулярных масс (100 пн и 1000 пн лестницам) отнимали длину последовательностей, фланкирующих UPS29 (включая праймеры) (т. е. 168 пн), полученную разницу делили на средний размер повтора (45 пн) и прибавляли длину первого повтора «А» (25 пн);

** — ожидаемый размер фрагментов ПЦР-амплификации последовательностей, включающих весь интрон, содержащий UPS29 и части экзонов, фланкирующих данный интрон, определяли на основании результатов секвенирования с праймеров cUP3 и cUP4 и известной длины фланкирующей ДНК до праймеров exUP5 и exUP6 (рис. 2а);

«—» — непроверенные образцы.

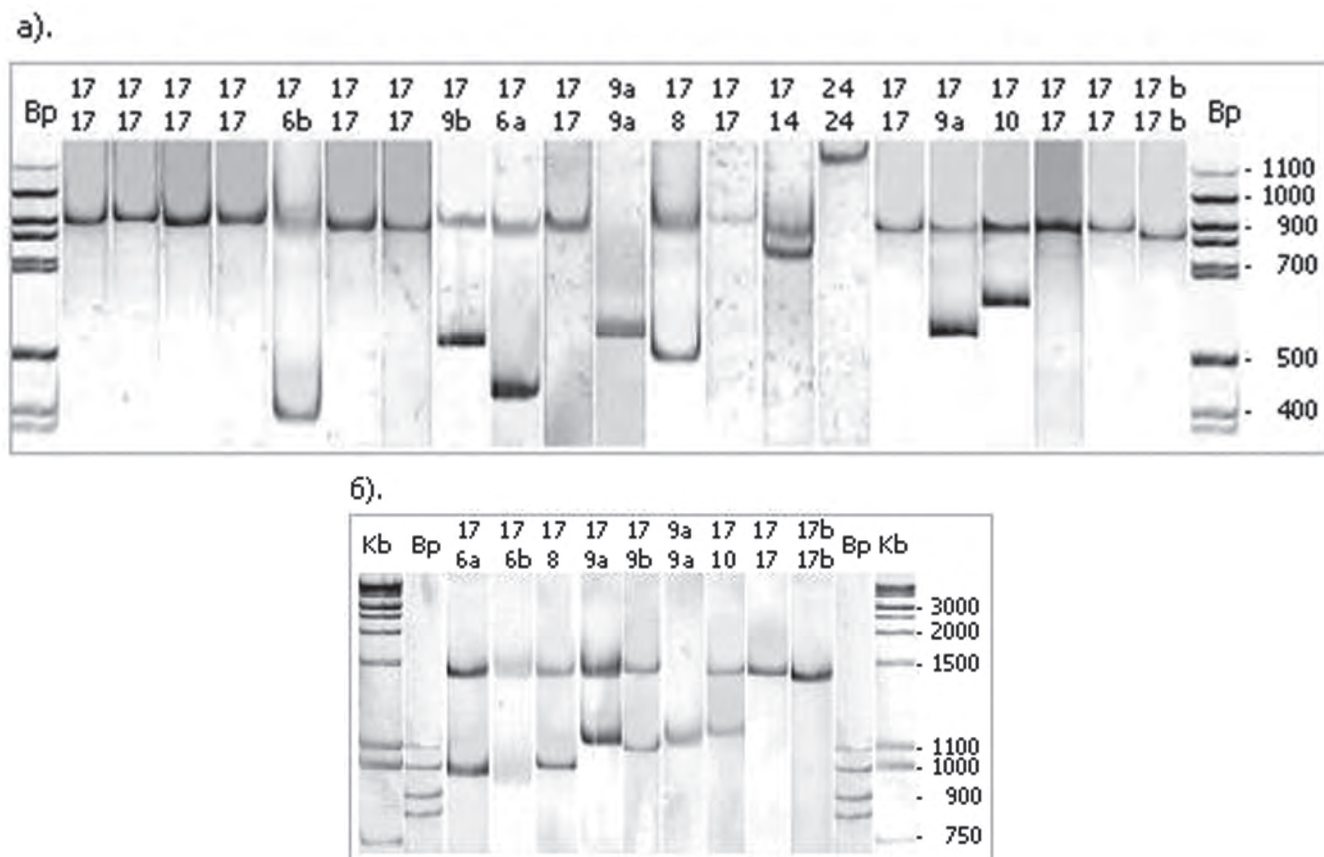


Рис. 3. Электрофореграммы продуктов ПЦР на ДНК из лейкоцитов периферической крови человека:

а) с праймеров cUP3 и cUP4;

б) с праймеров exUP5 и exUP6;

цифрами над дорожками обозначены варианты генотипов минисателлита UPS29;

Vp — маркер молекулярного веса с шагом 100 пн;

Kb — маркер молекулярного веса с шагом 1000 пн. 6 % ПААГ, окраска 0,1 % AgNO₃

Таблица 2

Частота встречаемости аллелей минисателлита UPS29 в выборке здоровых волонтеров города Санкт-Петербург

Аллели UPS29	Мужчины		Женщины		Мужчины и женщины	
	Количество, п	Частота, %	Количество, п	Частота, %	Количество, п	Частота, %
24	2	1,61 ± 1,13	0	0	2	0,58 ± 0,41
17	107	86,29 ± 3,09	206	94,50 ± 1,23	313	91,52 ± 1,51
14	0	0	1	0,46 ± 0,46	1	0,29 ± 0,29
10	1	0,81 ± 0,81	0	0	1	0,29 ± 0,29
9	10	8,06 ± 2,45	5	2,29 ± 1,01	15	4,39 ± 1,11
8	3	2,42 ± 1,38	2	0,92 ± 0,65	5	1,46 ± 0,65
6	1	0,81 ± 0,81	4	1,83 ± 0,91	5	1,46 ± 0,65
Редкие аллели, суммарно	17	13,71 ± 3,09	12	5,50 ± 1,23	29	8,48 ± 1,51
Всего аллелей	124		218		342	

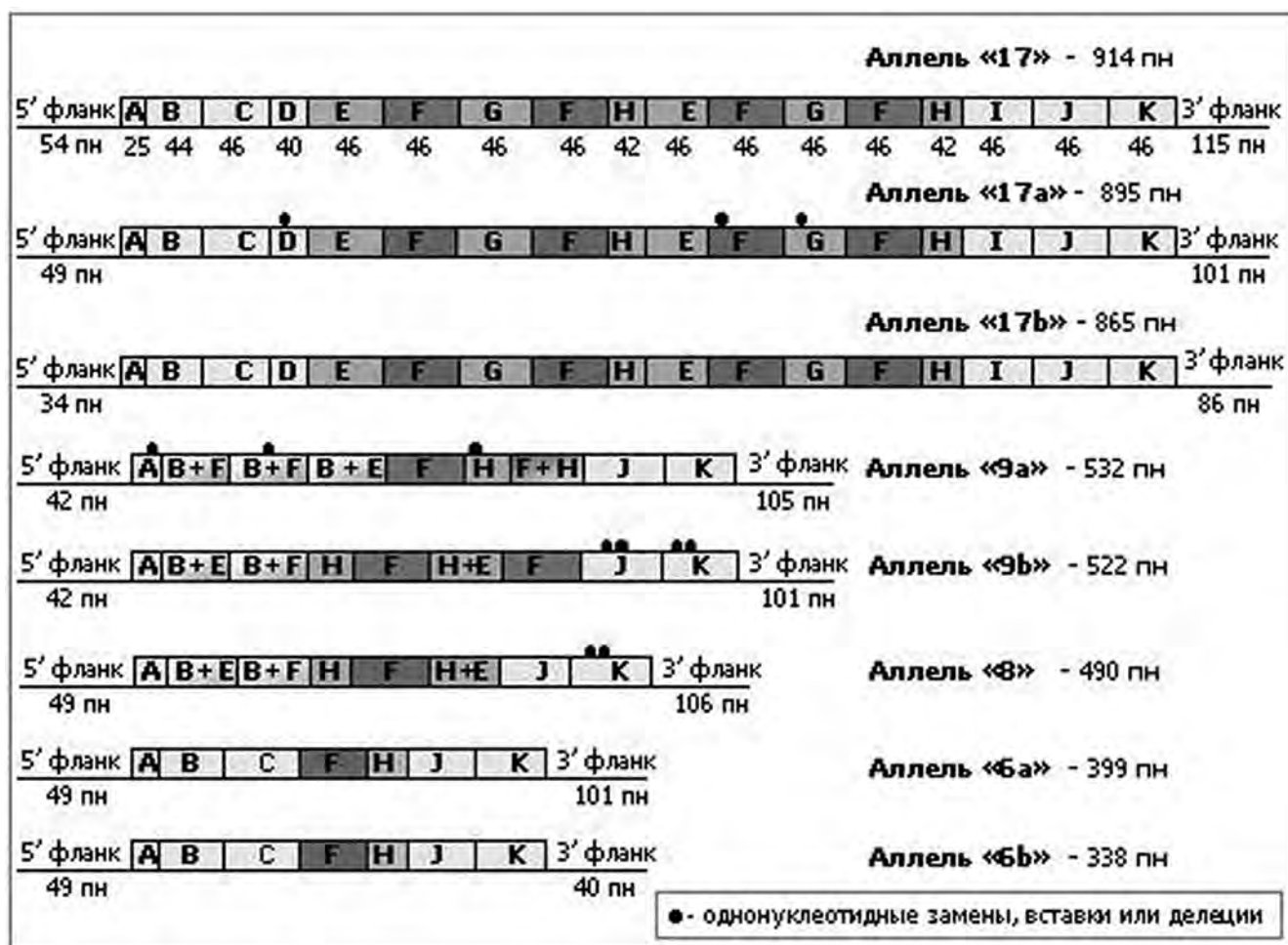


Рис. 4. Схематическое изображение аллельных вариантов минисателлита UPS29 по результатам секвенирования с праймеров c1UP3 и c1UP4 в сравнении с референтной последовательностью UPS29 (AL096805, GeneID: 116983; аллель «17», верхняя схема). Варианты повторяющихся единиц UPS29 обозначены как на рисунке 1. Под повторами отмечена их длина в парах нуклеотидов. Рядом с названием аллеля указан размер ПЦР-продукта с праймеров c1UP3 и c1UP4. Повторы «F+N» (46 пн), «B+E» (44 пн), «B+F» (44 пн) и «H+E» (42 пн) являются «гибридными» (см. текст)

что изменение длины UPS29 является редким мутационным событием, что говорит в пользу относительной стабильности данного минисателлита, несмотря на наличие в UPS29 потенциальных сайтов его нестабильности (результаты компьютерного анализа). Следует подчеркнуть, что эти результаты не противоречат данным анализа *in silico* нуклеотидной последовательности UPS29, который указывает на его потенциальную нестабильность, и не позволяет говорить о степени такой изменчивости в биологическом контексте под влиянием различных факторов.

Молекулярный механизм образования новых и, что самое интересное, преимущественно коротких, состоящих из 6, 8 и 9 повторов, аллельных вариантов UPS29 пока не ясен. По результатам секвенирования можно сказать, что укорочение UPS29 происходит за счет делеции внутренних повторов данного минисателлита, причем в некоторых случаях с формированием «гибрид-

ных» повторов (т. е. состоящих из разных повторяющихся мотивов). Можно предположить, что короткие аллели UPS29 являются результатом внутримолекулярных (внутрихроматидных) процессов, а не обменов между гомологичными хромосомами, поскольку в последнем случае в популяции должны были бы с равной вероятностью выявляться как длинные, так и короткие аллельные варианты UPS29, а в нашем случае в исследованной выборке был зафиксирован только один случай длинного аллеля, состоящего из 24 повторов. Возможно, участками инициации обмена между повторяющимися мотивами внутри UPS29 могли быть центральные области каждого повтора (рис. 1), а именно район с инвертированной последовательностью (GGGG atgg CCCCtgCCCC), в котором также находится участок CCTGCC гомологичный сайту, вносящему вклад в нестабильность минисателлитов человека в зародышевой линии [10]. Остаются вопросы, чем обусловлена преимущественная делеция

повторов «I», «C», «D», «G», почему «гибридными» бывают повторы «B+F», «B+E», «H+E» и может ли это быть связано с присутствием другой инвертированной последовательности — TGGG (в повторах «E», «I», «J» и «K») и CCCA (в повторах «A», «F» и «K») (рис. 1). Для того, чтобы могли произойти обмены внутри одной молекулы ДНК UPS29 (в хроматиде или хромосоме до репликации), то им должны предшествовать достаточно сложные изгибы, выпетливания и складывания двунитевой ДНК. Действительно, как было показано с помощью программы BEND.it (http://www.icgeb.trieste.it/dna/bend_it.html), UPS29 в середине каждой 46 пн повторяющейся единицы имеет участки, отвечающие за искривления ДНК *in vitro* [12, 15]. Кроме того, в образовании коротких аллелей UPS29 не исключается роль симметричного одностороннего выпетливания ДНК. Подобное явление ранее наблюдали *in vitro* для негиперварибельного минисателлита человека MsH42 [10, 11].

Для проверки предположения о возможной локализации обнаруженных коротких аллельных вариантов UPS29 в ином хромосомном локусе на образцах ДНК людей гомозиготных и гетерозиготных по коротким аллельным вариантам UPS29 была проведена ПЦР с другой парой праймеров — exUP5 и exUP6. Данные праймеры комплементарны экзонам 13 (14) и 14 (15) и позволяют оценить изменения общей длины интрона, где локализован минисателлит UPS29 (рис. 2а). Результаты ПЦР с этой парой праймеров показали (табл. 1, рис. 3б), что при изменении длины UPS29 (уменьшении числа повторов) наблюдается укорочение анализируемой интронной последовательности. При этом у гетерозигот амплифицируются длинный (содержащий варианты аллеля «17» UPS29) и короткий интронные последовательности, а у гомозигот по коротким аллелям UPS29 — только короткие интронные последовательности (рис. 3б). Эти данные являются доказательством локализации выявленных аллелей UPS29 в гомологичных хромосомных районах и указывают на отсутствие дупликаций как внутри анализируемого интрона, так и вне его.

Поскольку секвенированы были не все образцы ДНК, то в данном исследовании был проведен рестрикционный анализ ПЦР-продуктов 86 человек, из которых 65 человек были гомозиготы по аллелю «17», 12 человек — гетерозиготы «17–9», 2 человека — гетерозиготы «17–8», 5 человек — гетерозиготы «17–6» и 2 человека — гомозиготы «9–9». После рестрикции с помощью MspI в 29 образцах в 12 % ПААГ выявили четыре зоны — «171», «115», «92», «46», соответствующие ожидаемым фрагментам рестрикции, в 10 образцах наблюдали исчезновение зоны «115» и появление новой зоны «69», а в 46 образцах помимо «171», «115», «92», «46» зон была обнаружена зона «69». Кроме того, в одном образце наблюдали появление еще одной новой зоны «23» (рис. 5). Результаты рестрикционного анализа под-

твердили, что все проанализированные данным методом ПЦР-продукты соответствуют минисателлиту UPS29, а появление новых фрагментов рестрикции является результатом изменений нуклеотидной последовательности внутри UPS29. Так, появление зоны «69» при одновременном исчезновении зоны «115» и сохранении всех остальных ожидаемых фрагментов может быть следствием делеции повтора «I» или появлению в нем нового сайта MspI в результате однонуклеотидной замены Т на С или вставки С (при сохранении этого повтора в исходном положении). При сохранении зоны «115» появление зоны «23» может быть также связано с возникновением нового сайта MspI в результате однонуклеотидной замены Т на С или вставки С в одном или нескольких повторах («B», «D», «E», «G» и «H») либо при замене С на G или вставки G в повторах «C» и/или «F». В случае, когда аллель UPS29 теряет фрагмент «115», выявление зоны «23» может свидетельствовать о появлении дополнительного MspI сайта в повторе «J» также в результате однонуклеотидной замены или вставки (рис. 1, 2а). Результаты рестрикции (как у гомозигот, так и у гетерозигот) (рис. 5), где были обнаружены пять зон («171», «115», «92», «46» и «69») либо «171», «115», «92», «46» и «23») указывают на то, что данные индивидуумы имеют один аллель UPS29, сходный по картине рестрикции с исходным вариантом минисателлита («171», «115», «92», «46»), а другой с изменениями нуклеотидной последовательности («171», «92», «46» и «69») или «171», «92», «46» и «232»).

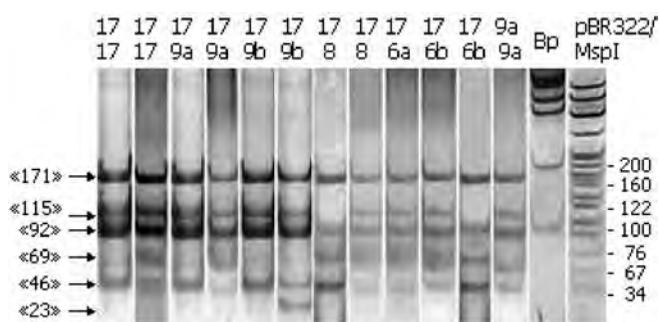


Рис. 5. Результаты рестрикционного анализа ПЦР-продуктов минисателлита UPS29 с праймеров clUP3 и clUP4 у нескольких человек гомозиготных и гетерозиготных по UPS29. Ферментативный гидролиз с помощью MspI. 12% ПААГ, окраска 0,1 % AgNO₃. Цифрами над дорожками обозначены генотипы UPS29. Bp — маркер молекулярного веса с шагом 100 пн. pBR322/MspI — плазмидный вектор pBR322, обработанный рестриктазой MspI. Стрелками указаны выявленные фрагменты рестрикции, рядом с ними цифрами обозначен их теоретически ожидаемый размер, исходя из известной референтной нуклеотидной последовательности UPS29. Справа отмечен размер некоторых фрагментов в парах нуклеотидов для маркера молекулярного веса и pBR322/MspI

Наблюдаемое распределение генотипов по UPS29 соответствует равновесному распределению генотипических частот Харди-Вайнберга ($\chi^2 = 0,195$, $p < 0,01$). Поскольку было обнаружено 7 аллелей UPS29, то следовало ожидать 28 генотипов, однако было идентифицировано только 8. Генотипический анализ UPS29 в данной выборке показал (табл. 3), что исследуемый минисателлит преимущественно находится в гомозиготном состоянии по аллелю «17». Наблюдаемая гетерозиготность UPS29 составляет 12,3 %, что статистически достоверно ($F = 0,96$, $p < 0,01$) не отличается от ожидаемой гетерозиготности (16,0 %).

Как известно, мультиаллельные локусы не всегда характеризуются большей гетерозиготностью по сравнению с малоаллельными локусами [1], но это относится преимущественно к кодирующим последовательностям, тогда как для большинства описанных на сегодняшний день VNTR характерна высокая частота гетерозиготности. По сравнению с другими ГЦ-богатыми минисателлитами обнаруженная для UPS29 гетерозиготность является достаточно низкой. Для многих ГЦ-богатых минисателлитов данный показатель составляет более 50 %, и такие минисателлиты классифицируют как гипермутабельные [7, 9, 14].

Особый интерес вызывает тот факт, что среди гетерозигот не было выявлено ни одного человека, у которого UPS29 был бы представлен двумя различными короткими аллелями, все гетерозиготы всегда имели аллель «17» и один из редких (коротких) аллелей, что, по-видимому, может объясняться достаточно низкой частотой последних. Как следует из закона Харди-Вайнберга [1, 4], редкие аллели присутствуют в популяции главным образом в гетерозиготном, а не гомозиготном состоянии, что и наблюдается для UPS29. Так, короткие аллели UPS29 находятся в гетерозиготном состоянии примерно в 7 раз чаще, чем в гомозиготном. Наблюдаемое в нашем случае повышение частоты гомозигот по редким аллелям UPS29 («24–24» и «9–9») по сравнению с теоретически ожидаемой частотой не являлось статистически значимым.

В исследованной выборке не были обнаружены гендерные различия по частоте появления индивидуумов, несущих в своем геноме редкие (короткие) аллели UPS29. Анализ UPS29 в разных возрастных группах (старше 15 лет) не выявил увеличения частоты редких (коротких) аллелей с возрастом. Следовательно, короткие аллели UPS29 не возникают в постнатальный период развития (если исключить возможность соматической нестабильности UPS29 в детском и подростковом возрасте), а наследуются, и изменение длины UPS29 должно происходить в раннем эмбриогенезе/гаметогенезе. В пользу наследуемости коротких аллелей UPS29 говорят результаты семейного анализа. Были исследованы образцы ДНК 66 человек из 27 се-

мей, представленных 2–3 поколениями. В 9 семьях как у родителей, так и у детей были обнаружены короткие аллели UPS29, тогда как в остальных семьях и у родителей и у детей они не были выявлены, то есть не происходило образование аллелей *de novo* (данные не представлены).

Таким образом, несмотря на высказанное выше по результатам компьютерного анализа предположение о возможном высоком уровне изменчивости UPS29, данные молекулярно-генетического анализа указывают на то, что UPS29 может быть отнесен к группе низко-полиморфных негипервариабельных минисателлитов (по оценке общей протяженности минисателлита) по классификации F. Deneud с соавторами [14]. В настоящее время в геноме человека описан только один низко-полиморфный ГЦ-богатый минисателлит MsH42, который локализован в интроне 5 гена *Q9ULM1* [10, 11]. Данный минисателлит, хотя и имеет внутри себя сайты, гомологичные горячим точкам рекомбинации, но в популяции представлен только 3 аллелями. Однако в экспериментах *in vitro* MsH42 в составе плазмиды стимулировал внутриаллельную гомологичную рекомбинацию [9, 10, 11]. Нельзя исключить, что и для минисателлита UPS29 может иметь место подобное свойство. Относительная стабильность минисателлита UPS29, несмотря на наличие некоторых горячих точек рекомбинации и сайтов образования вторичных структур ДНК, косвенно указывает на существование неких факторов, в норме ингибирующих его потенциальную нестабильность. Такими факторами могут являться разнообразные факторы внешней среды. Обнаруженная в данном исследовании низкая спонтанная полиморфность UPS29 может приводить к тому, что даже незначительные отклонения между аллелями в его величине или структуре могут являться причиной возникновения патологий, обусловленных изменением уровня экспрессии гена *CENTB5* или близлежащих генов.

Благодарность. Хотелось бы выразить признательность за предоставленные образцы ДНК человека сотрудникам отдела молекулярной генетики ГУ НИИЭМ РАМН — профессору, д. б. н. Пучковой Л. В., д. б. н. Цымбаленко Н. В. (лаб. молекулярной генетики человека), д. б. н. Мандельштаму М. Ю., д. б. н. Шварцману А. Л., к. м. н. Голубкову В. И., к. б. н. Тихомировой О. С. (лаб. биохимической генетики), а также зав. лаб. высокотехнологичных методов молекулярного анализа Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. И. П. Павлова, к. б. н. Пчелиной С. Н.

Работа поддержана грантом Президента Российской Федерации для молодых российских ученых — кандидатов наук, проект № МК — 2840.2007.7.

Литература

1. Айала Ф. Современная генетика. В 3-х т., Т.3.: пер. с англ. / Айала Ф., Кайгер Дж.; пер. с англ. Базыкина А. Д. — М.: Мир, 1988. — 335 с.
2. Аксенова М. Г. Аллельный полиморфизм гена переносчика дофамина в группах больных эндогенными психозами. Связь с патологическими синдромами / Аксенова М. Г., Голимбет В. Е., Алфимова М. В., Носиков В. В. // Молекулярная биология. — 2000. — Т. 34, № 4. — С. 696–700.
3. Ивантер Э. В. Основы биометрии: введение в статистический анализ биологических явлений и процессов / Ивантер Э. В., Коросов А. В. — Петрозаводск.: Изд-во Петрозаводского гос. университета, 1992. — 168 с.
4. Кайданов Л. З. Генетика популяций // Кайданов Л. З. — М.: Высш. шк., 1996. — 320 с.
5. Паткин Е. Л. Сателлитные ДНК и болезни — возможные механизмы. Нестабильность минисателлитов / Паткин Е. Л., Гайцхоки В. С. // Генетика. — 2000. — Т. 36, № 9. — С. 1189–1194. (Patkin E. L., Gaitskhoki V.S. Satellite DNAs and diseases — possible mechanisms: minisatellite instability // Rus. J. Genetics. — 2000. — Vol. 36, N 9. — P. 989–993.)
6. Плохинский Н. А. Биометрии // Плохинский Н. А. — М.: Изд-во МГУ, 1970. — 368 с.
7. Andreassen R. De novo mutation and allelic diversity at minisatellite locus D7S22 investigated by allele-specific four-state MVR-PCR analysis / Andreassen R., Olaisen B. // Hum. Mol. Genet. — 1998. — Vol. 7. — P. 2113–2120.
8. Benson G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences / Benson G. // Nucl. Acid Res. — 1999. — Vol. 27. — P. 573–580.
9. Birth and evolution history of a human minisatellite / Boan F., Blanco M. G., Quinteiro J. [et al.] // Mol. Biol. Evol. — 2004. — Vol. 21. — P. 228–235.
10. Boan F. Molecular characterization of a new human minisatellite that is able to form single-stranded loops in vitro and recognized by nuclear proteins / Boan F., Gonzalez A. I., Rodriguez J. M., Gomez-Marquez J. // FEBS Letters. — 1997. — Vol. 418. — P. 251–257.
11. Boan F. A non-hypervariable human minisatellite strongly stimulates in vitro intramolecular homologous recombination / Boan F., Rodriguez J. M., Gomez-Marquez J. // J. Mol. Biol. — 1998. — Vol. 278. — P. 499–505.
12. Brukner I. Sequence dependent bending propensity of DNA as revealed by DNase I: Parameters for trinucleotides / Brukner I., Sanchez R., Suck D., Pongor S. // EMBO J. — 1995. — Vol. 14. — P. 1812–1818.
13. Buard J. Complex recombination events at the hypervariable minisatellite CEB1 (D2S90) / Buard J., Vergnaud G. // EMBO J. — 1994. — Vol. 13. — P. 3203–3210.
14. Denoeud F. Predicting human minisatellite polymorphism / Denoeud F., Vergnaud G., Benson G. // Genome Res. — 2003. — Vol. 13. — P. 856–867.
15. Goodsell D. S. Bending and curvature calculations in B-DNA / Goodsell D. S., Dickerson R. E. // Nucl. Acids Res. — 1994. — Vol. 22. — P. 5497–5503.
16. Human chromosomal fragile site FRA16B is amplified AT-rich minisatellite repeat / Yu S., Mangelsdorf M., Hewett D. [et al.] // Cell. — 1997. — Vol. 88. — P. 367–374.
17. Jobling M. A. Hypervariable digital DNA codes for human paternal lineages: MVR-PCR at the Y-specific minisatellite, MSY1 (DYF155S1) / Jobling M. A., Biuzekri N., Taylor P. G. // Hum. Mol. Genet. — 1998. — Vol. 7. — P. 643–653.
18. MacKenzie A. A serotonin transporter gene intron 2 polymorphic region, correlated with affective disorders, has allele-dependent differential enhancer-like properties in the mouse embryo / MacKenzie A., Quinn J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1999. — Vol. 96. — P. 15251–15255.
19. Molecular basis for expression of common and rare fragile sites / Zlotorynski E., Rahat A., Skaug J. [et al.] // Mol. Cell Biol. — 2003. — Vol. 23. — P. 7143–7151.
20. Ovarian cancer risk in BRCA1 carriers is modified by the HRAS1 variable number of tandem repeat (VNTR) locus / Phelan C. M., Rebbeck T. R., Weber B. L. [et al.] // Nat. Genet. — 1996. — Vol. 12. — P. 309–311.
21. Papadakis E. N. Genetic analysis of H-ras intron-1 polymorphic and variable tandem repeat regions in human breast cancer / Papadakis E. N., Dokianakis D. N., Spandidos D. A. // Int J. Biol. Markers. — 2003. — Vol. 18. — P. 195–199.
22. Structure of Chi hotspots of generalized recombination / Smith G. R., Kunes S. M., Schultz D. W. [et al.] // Cell. — 1981. — Vol. 24. — P. 429–436.
23. The use synthetic tandem repeats to isolate new VNTR loci: cloning of a human hypermutable sequence / Vergnaud G., Moriat D., Apiou F. [et al.] // Genomics. — 1991. — Vol. 11. — P. 135–144.
24. Vergnaud G. Minisatellites: mutability and genome architecture / Vergnaud G., Denoeud F. // Genet. Res. — 2000. — Vol. 10. — P. 899–907.
25. Weinreb A. Site of unequal sister chromatid exchange contains a potential Z-DNA-forming tract / Weinreb A., Katzenberg D. R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1988. — Vol. 85. — P. 529–533.

Molecular-genetic characterization of the human non-hypervariable GC-rich minisatellite UPS29 of gene *CENTB5*

Suchkova I. O. , Shubina D. M., Sasina L. K., Slominska N. O., Vasilyev V. B., Alenina N., Bader M., Patkin E. L.

✿ **SUMMARY:** Human minisatellite UPS29 localized in one of *CENTB5* introns was studied *in silico* and using molecular genetic analysis. For

the first time there were revealed seven UPS29 alleles which contained 6–24 repeated units. Allele consisting of 17 repeats was prevailed (91,5 %). Frequency of other alleles varied from 0,29 % to 4,39 %. UPS29 heterozygosity was 12,3 %. Minisatellite UPS29 was classified as low polymorphic and non hypervariable.

✿ **KEY WORDS:** minisatellite DNA, heterozygosity, genetic variability, intra-molecular exchanges