

## ПРЕДИСЛОВИЕ

Настоящее учебное пособие является переработанным и дополненным вариантом лекций «Основы мутагенеза и генотоксикологии», изданных в 2012 г. ограниченным тиражом и получивших положительные отклики. Спецкурс по мутагенезу и генетической токсикологии на биологическом факультете МГУ читается студентам 5-го курса кафедры генетики. Это означает, что часть материала им знакома по курсам по общей генетике и молекулярной генетике. Однако программа настоящего спецкурса предполагает обобщение основных положений теории мутагенеза с точки зрения естественных и антропогенных факторов, приводящих к нестабильности генома, с которой связывают многообразие и эволюцию биологических объектов. Однако мутагенные факторы — как естественные, так и антропогенные — по отношению к человеку являются вредными. Мутации у человека являются причиной как моногенных, так и многофакторных заболеваний, раннего старения, предрасположенности к токсическому действию чужеродных химических соединений — ксенобиотиков.

Программа спецкурса состоит из двух частей — мутагенеза и генетической токсикологии. Поэтому в первой части учебного пособия рассматриваются типы мутаций, их особенности и молекулярные механизмы возникновения, а также факторы индуцированного мутагенеза.

В главе о хромосомных aberrациях приведены современные данные о микроделециях, с которыми связывают ряд болезней человека, получивших название микроделеционных синдромов. Обсуждается роль низкокопийных повторов в ДНК и неаллельной гомологичной рекомбинации в возникновении различных типов хромосомных aberrаций. Механизм возникновения хромосомных aberrаций рассматривается и в главе по репарации ДНК, в части репарации двунитевых разрывов.

Индукционному мутагенезу посвящены главы инсерционного, радиационного и химического мутагенеза. В главе по радиационному мутагенезу значительное внимание уделено таким общим вопросам радиационной биологии, как биологические эффекты ионизирующих излучений, дозы, проблемы оценки генетических последствий. Это сделано, чтобы восполнить отсутствие преподавания студентам-генетикам такого предмета, как радиационная биология. В главе по инсерционному мутагенезу большое внимание уделено мобильным генетическим элементам,

вносящим особо весомый вклад в инсерционный мутагенез, хромосомные перестройки и дестабилизацию геномов. Подробно описывается классификация мобильных генетических элементов и механизмы их транспозиций из одного участка генома в другой, а также роль транспозиций в инсерционном мутагенезе. Основным группам химических мутагенов и механизмам их мутагенного действия посвящена отдельная глава.

Следует отметить, что материалы, изложенные в первой части, могут быть использованы студентами при подготовке к экзаменам по таким разделам молекулярной генетики, как рекомбинация и репарация.

Вторая часть пособия — это основы генетической токсикологии, прикладного научного направления, основной задачей которого является оценка генетических последствий загрязнения окружающей среды генотоксичными агентами. Под генотоксичными агентами имеются в виду главным образом химические соединения, способные повреждать ДНК у живых организмов и вызывать наследственные изменения. Генетическая токсикология опирается на достижения современной генетики, биохимии чужеродных соединений и токсикологии.

Основы генетической токсикологии излагаются в учебном пособии впервые. Это ценно потому, что спецкурс приходилось читать по обзорам и материалам некоторых монографий, а отсутствие учебного пособия затрудняло подготовку студентов к экзамену.

Основное внимание уделено тест-системам, стратегии тестирования и проблеме оценки полученных экспериментальных результатов по отношению к человеку. Во всех главах этой части учебника красной нитью проходит мысль, что генотоксичность тест-специфична, то есть результат зависит от того, что мы регистрируем (повреждения ДНК, мутации генные или хромосомные) и на каком тест-объекте (микроорганизмы, растения, культуры клеток, млекопитающие). Каждая тест-система имеет свою чувствительность и специфичность, которая также зависит от набора веществ в базе данных, использованных для ретроспективного анализа, и от того объекта или активности по отношению к которому калибруется тест-система. В этой связи рассматривается проблема оценки прогностической эффективности тест-систем в аспекте применения отдельных тест-систем или их батареи для прогнозирования генетических последствий для человека. Дан анализ применения различных тест-систем для генетического мониторинга накопления генотоксичных загрязнений в таких компонентах окружающей среды, как вода, воздух и почва.

Отдельное внимание уделено биотрансформации химических соединений в организме млекопитающих, которая осуществляется различными ферментными системами, а мутации в генах этих ферментов обуславливают вариации чувствительности людей к действию генотоксичных агентов. Почти в каждом разделе этой части пособия есть упоминания или экспериментальные доказательства того, что между генотоксичностью химического соединения и его канцерогенной активностью для грызунов существует определенная связь. В этой связи наличие раздела, посвященного мутагенезу и канцерогенезу, на наш взгляд, является логичным.

Заключительным разделом является антимуtagenная защита генома, в котором рассматриваются антимуtagenные факторы — как внутриклеточные, так и экзогенные.

Выражаем особую благодарность профессору кафедры генетики М. М. Асланяну, соавтору изданных ранее лекций «Основы мутагенеза и генотоксикологии», за ценные советы и замечания.

Приносим свою признательность заведующему кафедрой генетики В. В. Зинченко, профессорам кафедры А. И. Ким и Т. А. Ежовой за поддержку.

# ЧАСТЬ I

## МУТАГЕНЕЗ

### Глава 1

#### НАСЛЕДСТВЕННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ

##### 1.1. Виды наследственной изменчивости

**Изменчивость** — это свойство живых организмов приобретать признаки, отличающие их от родителей. Она зависит от возраста, индивидуальных особенностей и от условий среды, в которой развивается и существует организм. Полученная от родителей генетическая информация определяет возможности развития признака, реализация которых зависит от определенных условий. Одна и та же генетическая информация в разных условиях может проявляться по-разному. Например, если один и тот же сорт растений выращивается на полях с различными условиями по влажности и по содержанию питательных веществ, то различия в урожайности будут обусловлены влиянием этих условий.

Любая наблюдаемая изменчивость является фенотипической и включает в себя наследственную (генетическую) и ненаследственную (модификационную).

*Наследственная изменчивость (генетическая, или генотипическая изменчивость)* обусловлена изменением генотипа. В ее основе лежит *мутационная* и *комбинативная* изменчивость.

**Комбинативная изменчивость** — это рекомбинация генов родителей у потомков без изменения структуры генетического материала. Механизмы комбинативной изменчивости:

1. Свободное комбинирование хромосом и хроматид при расхождении их в мейозе.
2. Мейотический кроссинговер (рекомбинация генов).
3. Случайное сочетание гамет с разным генотипом при оплодотворении.
4. Обмен плазмидами между клетками бактерий.

Комбинативная изменчивость является главным источником генетического разнообразия. Даже при наличии лишь небольшого числа локусов, содержащих по два аллеля, только при рекомбинации (вследствие перемешивания генных комплексов) возникает множество уникальных генотипов.

**Мутационная изменчивость** обусловлена мутациями — устойчивыми изменениями генетического материала. Термин «мутация» был предложен голландским ботаником Гуго де Фризом в 1901 г. В настоящее время принято следующее определение мутаций.

**Мутации — это наследуемые изменения генетического материала.** Мутации представляют собой как качественные, так и количественные изменения в геноме организма.

В естественных условиях мутации возникают спонтанно и случайно, т. е. невозможно предсказать, где, когда и какое изменение произойдет. Можно только оценить вероятность мутации в популяциях, зная фактические частоты определенных мутаций. Например, вероятность появления у кишечной палочки устойчивости к тетрациклину равна  $10^{-10}$ , поскольку лишь одна из 10 миллиардов клеток обнаруживает устойчивость к этому антибиотику, но всё потомство этой бактерии будет устойчивым к тетрациклину.

В табл. 1.1 приведены примеры частот спонтанного мутирования некоторых генов у различных организмов на геном за генерацию. При этом имеется в виду, что генерация — это одно деление для одноклеточных и одно поколение для многоклеточных.

Таблица 1.1

**Частота спонтанного мутирования некоторых генов у различных организмов (Инге-Вечтомов, 2010, с сокр.)**

Организм/признак	Частота мутаций	Организм/признак	Частота мутаций
<i>Bacteriophage T2</i>		<i>Drosophila melanogaster</i>	
Круг хозяев	$3 \times 10^{-9}$	Белые глаза	$4 \times 10^{-5}$
Подавление лизиса	$1 \times 10^{-8}$	Желтое тело	$1 \times 10^{-4}$
<i>Esherichia coli</i>		<i>Mus musculus</i>	
Устойчивость к стрептомицину	$4 \times 10^{-10}$	Коричневая окраска	$3 \times 10^{-5}$
Усвоение галактозы	$2 \times 10^{-10}$	Альбинизм	$3 \times 10^{-5}$
Усвоение лактозы	$2 \times 10^{-7}$	Пегость	$3 \times 10^{-5}$

Организм/признак	Частота мутаций	Организм/признак	Частота мутаций
<i>Neurospora crassa</i>		<i>Homo sapiens</i>	
Восстановление прототрофности по аденину	$4 \times 10^{-8}$	Ретинобластома (опухоль сетчатки глаза)	$1 \times 10^{-5}$
Восстановление прототрофности по инозиту	$8 \times 10^{-8}$	Гемофилия А	$2 \times 10^{-5}$
<i>Salmonella typhimurium</i>		Ахондриоплазия (карликовость)	$4-8 \times 10^{-5}$
Восстановление прототрофности по триптофану	$5 \times 10^{-8}$	Альбинизм	$3 \times 10^{-5}$
Устойчивость к стрептомицину	$1 \times 10^{-10}$	Микроцефалия	$3 \times 10^{-5}$

Мутабельность гена (т. е. частота появления определенной мутации) зависит от природы гена: существуют гены, склонные к мутированию, и относительно стабильные гены. Организм, во всех клетках которого обнаруживается мутация, называется *мутантом*. Это происходит в том случае, если данный организм развивается из мутантной клетки (гаметы, зиготы, споры). Различают *новые* мутации (возникающие *de novo*) и *старые* мутации. Старые мутации — это мутации, появившиеся в популяции задолго до начала их изучения; они определяют генетический полиморфизм. Новые мутации — это мутации, появляющиеся в потомстве немутантных организмов ( $\text{♀ AA} \times \text{♂ AA} \rightarrow \text{Aa}$ ).

В ряде случаев мутация обнаруживается не во всех соматических клетках организма; такой организм называют *генетическим мозаиком*. Это происходит, если мутации появляются на разных стадиях онтогенеза. Различают *мозаицизм половых клеток*, когда мутация возникает *de novo* в половых клетках или их предшественниках в раннем эмбриональном развитии родителя. Например, больные дети рождаются повторно у клинически и фенотипически нормальных родителей. *Соматический мозаицизм* вызван мутациями, возникшими в ходе митотических делений клетки эмбриона с последующим клональным увеличением числа аномальных клеток. Тяжесть фенотипического эффекта соматического мозаицизма зависит от стадии развития, на которой происходит мутация.

## 1.2. Доказательства спонтанной природы мутаций

Доказательство того, что мутации у бактерий происходят спонтанно, было получено в экспериментах С. Лурии и М. Дельбрюка в 1943 г. Метод, получивший название *флуктуационный тест Лурии и Дельбрюка*, достаточно прост: использовали чашки Петри с питательной средой, бактериофагами и чувствительными к фагу бактериями. Проводили серию испытаний, в ходе которых на эти чашки высевали одинаковое количество бактерий, изначально чувствительных к бактериофагу. В течение непродолжительного времени большая часть бактерий лизировалась фагом, но некоторые выживали и начинали делиться, образуя колонии. Эти колонии состояли из мутантов, устойчивых к фагу. Проверке подлежали две распространенные в то время гипотезы:

1. Мутации происходят спонтанно, независимо от внешней среды.
2. Мутации возникают как результат приспособления к среде.

Для понимания логики эксперимента Лурии и Дельбрюка рассмотрим гипотетический пример. Представим, что четыре культуры *E.coli*, образованные от одной клетки бактерии, чувствительной к фагу, выращивали в течение четырех генераций, так что в каждой культуре оказалось 16 дочерних бактерий, а во всех четырех культурах — 64 дочерние клетки. В случае верности второго предположения, адаптивные изменения в геноме бактерии должны возникнуть под воздействием фага, то есть они могут происходить только при контакте с ним. Тогда устойчивые к фагу колонии должны быть распределены по четырем чашкам случайным образом (рис. 1.1.б). В случае спонтанного возникновения мутаций, то есть независимо от присутствия фага, будет наблюдаться другая картина (рис. 1.1.а). В 1-й культуре мутация устойчивости к фагу произошла в последней генерации, что привело к образованию двух мутантных бактерий, в 3-й культуре мутация произошла в течение первой генерации, что дало в конце опыта восемь мутантных бактерий. Во 2-й и 4-й культурах мутаций устойчивости к фагу не произошло.

Эксперимент Лурии и Дельбрюка, подтвердивший гипотезу о спонтанной природе мутирования, заключался в следующем: в 20 пробирок с 0,2 мл питательной среды в каждой (индивидуальные культуры) и в одну большую пробирку с 10 мл среды (общая культура) внесли клетки *E.coli* из расчета примерно по  $10^3$  на 1 мл. Культуры инкубировали до достижения плотности около  $10^8$  клетки/мл. Затем содержимое каждой из 20 индивидуальных культур объемом 0,2 мл высеяли на отдельные чашки

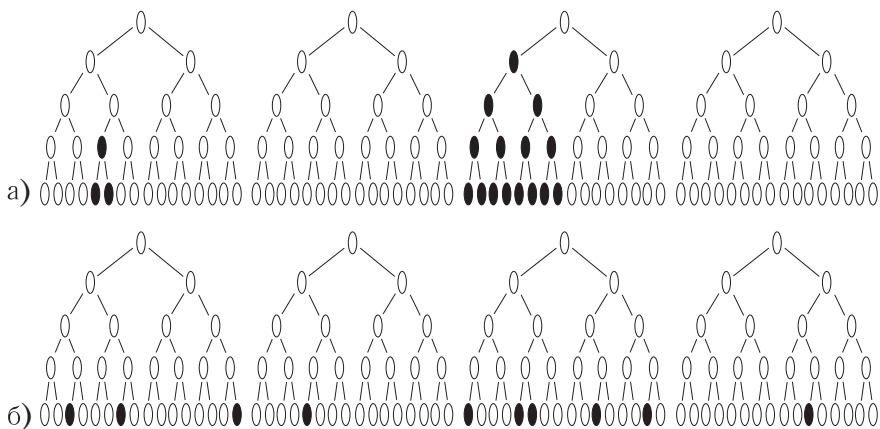


Рис. 1.1. Распределение мутантных устойчивых к фагам колоний бактерий по чашкам:

- а) мутации происходят в результате приспособления к среде;
- б) мутации устойчивости происходят спонтанно. Закрашенные клетки — мутанты.

с питательным агаром, содержащим фаг Т1 в высокой концентрации. Из общей культуры на отдельные чашки выселили десять параллельных проб по 0,2 мл. В табл. 1.2 приведено количество устойчивых к фагу колоний, образовавшихся после инкубации. Видно, что среднее число колоний на одну чашку в варианте опыта с индивидуальными культурами составляет 11,3, а в варианте с общей культурой — 16,7. Эти значения достаточно близки, однако наблюдаются большие флуктуации числа колоний вокруг среднего (дисперсия) в варианте опыта с индивидуальными культурами — 694 против 15 у дисперсии общей культуры.

Таблица 1.2

**Число устойчивых к фагу Т 1 мутантов *E.coli* в пробах из разных культур и из одной культуры (Luria, Delbruck, 1943)**

Индивидуальные культуры		Общая культура	
Номер культуры	Число устойчивых мутантов	Номер пробы	Число устойчивых мутантов
1	1	1	14
2	0	2	15



Индивидуальные культуры		Общая культура	
Номер культуры	Число устойчивых мутантов	Номер пробы	Число устойчивых мутантов
3	3	3	13
4	0	4	21
5	0	5	15
6	5	6	14
7	0	7	26
8	5	8	16
9	0	9	20
10	6	10	13
11	107	–	–
12	0	–	–
13	0	–	–
14	0	–	–
15	1	–	–
16	0	–	–
17	0	–	–
18	64	–	–
19	0	–	–
20	35	–	–
<b>Среднее</b>	11,3	<b>Среднее</b>	16,7
<b>Дисперсия</b>	694	<b>Дисперсия</b>	15

В случае адаптации дисперсия числа устойчивых клеток должна равняться их среднему числу, при спонтанном возникновении устойчивости — многократно превышать среднее, что проявилось в опыте с индивидуальными культурами. Таким образом, в эксперименте Лурии и Дельбрюка с «индивидуальными» и «общими» культурами *E.coli* было получено убедительное доказательство в пользу гипотезы спонтанного мутирования.

Оригинальный опыт Лурии — Дельбрюка был усовершенствован в 1952 г. супругами Дж. и Э. Ледерберг с помощью *метода реплик*. Его суть заключалась в том, что сначала бактерии разводили в питательной среде без фага, высевали на чашку с питательной средой, подращивали, потом с этой чашки делали отпечаток на стерильную ворсистую ткань, а затем с него делали отпечатки (реплики) на несколько чашек, содержащих высокую концентрацию фага T1. После инкубации на каждой чашке-реплике появлялись по нескольку устойчивых к фагу мутантов, расположение которых было одинаковым на каждой из чашек-реплик (рис. 1.2).

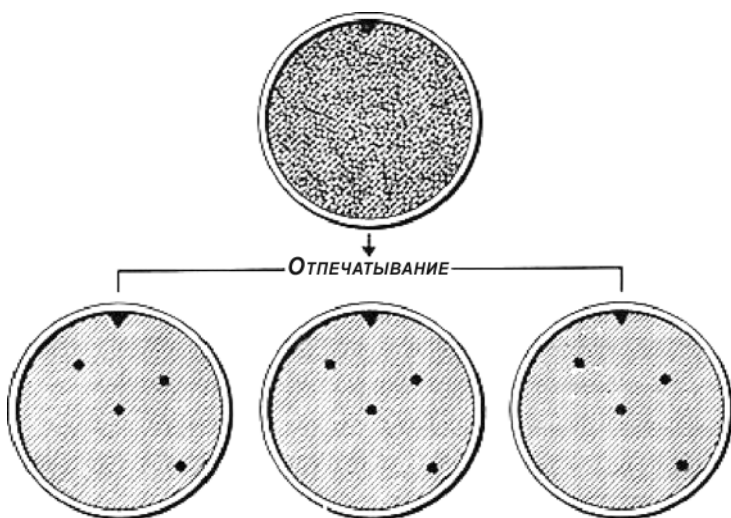


Рис. 1.2. Метод реплик

Мутантные колонии располагаются в одних и тех же местах чашек-реплик.  
Треугольник у верхнего края чашки обозначает ее ориентацию

Если бы устойчивость этих колоний к фагу T1 была индуцирована у перепечатанных на чашку-реплику бактерий только после их контакта с фагом, то такой случайный процесс не мог бы дать одинаковое расположение колоний-мутантов на параллельных чашках-репликах. Тот факт, что любая колония, устойчивая к фагу, всегда появляется на параллельных чашках-репликах на одном и том же месте, может означать, что на этом месте исходной чашки, с которой сделан отпечаток,

уже существовал клон мутанта. Поскольку исходная чашка не содержала фагов, то и полученные результаты указывают на то, что устойчивость к фагу имеет спонтанное происхождение.

### 1.3. Спонтанные мутации у человека

**Частота *de novo* мутаций.** Частоты возникновения мутаций должны определяться в половых клетках. *De novo* мутация — это наследственное изменение, присутствующее у ребенка, но отсутствующее у родителей. Мутации возникают в половых клетках одного из родителей, и частота возникновения мутаций в половых клетках определяется как:

$$\mu = (\text{число носителей } de\ novo \text{ -мутаций}) / (2 \times \text{общее число детей}).$$

Перечисленные требования к определению частоты мутаций у человека указывают на приблизительность существующих оценок частоты мутаций, основанных главным образом на встречаемости моногенных заболеваний в популяции. Однако развитие новых технологий секвенирования генома человека позволило приблизиться к решению этой проблемы.

В 2012 г. в журнале Nature были опубликованы результаты пилотной фазы проекта «1000 геномов» (1000 Genomes Project); он выполняется консорциумом примерно из 75 университетов и компаний, а основной его целью является глубокое и полное исследование полиморфизма ДНК человека в различных популяциях. Проект стартовал в 2008 г., планируется секвенировать 2500 геномов из 12 популяций с использованием различных подходов, в том числе полногеномного секвенирования и глубокого секвенирования экзонов.

К основным результатам проекта относится описание локализации, аллельных частот и структур гаплотипов (гаплотип — специфическое сочетание аллелей в генотипе) приблизительно для 15 миллионов SNP (единичных нуклеотидных замен), 1 миллиона коротких вставок и делеций и 20 тысяч структурных вариаций генома. Более половины всех вариаций выявлены впервые. Кроме того, было рассчитано, что индивидуальные различия в кодирующих областях в сравнении с референсным геномом сводятся к 10–11 тысячам несинонимических SNP (приводят к замене аминокислоты в белке) и 10–12 тысячам синонимических SNP

(не приводят к замене аминокислоты). По оценкам исследователей, геном каждого человека содержит в гетерозиготном состоянии 250–300 функционально неактивных генов и 50–100 мутаций, связанных с наследственными заболеваниями. Полученные данные позволили оценить степень расхождения между популяциями и влияние естественного отбора на геном. Использование семей дало также возможность оценить частоту возникновения мутаций *de novo* в половых клетках.

В проекте при анализе полученных результатов анализировались следующие типы мутаций:

1. Нуклеотидные замещения = Nucleotide substitutions
2. Инсерции и делеции (индел) = Insertions & deletions (indel)  
±1–1000 п. н.
3. Транспозиции = Transpositions  
±100–1000 п. н.
4. Мутации, нарушающие копийность = Copy number variants, CNV  
±1000– $3 \times 10^6$  п. н. (не видны под микроскопом)

Структурные хромосомные aberrации ( $> \pm 3 \times 10^6$  п. н.) и численные хромосомные aberrации (трисомия и моносомия) не рассматривались.

Для определения частоты нуклеотидных замещений, возникших *de novo* в половых клетках человека, было проведено секвенирование геномов 219 индивидов из 78 семей Исландии. Было показано, что ребенок рождается в среднем с 63,2 мутациями, которые не были обнаружены у родителей. Это означает, что частота возникновения *de novo* мутаций у ребенка составляет  $1,20 \times 10^{-8}$  на н., то есть примерно  $1 \times 10^{-8}$  на п. н. в каждом поколении.

В геноме человека повторяющиеся последовательности делятся на:

Минисателлиты с длиной повторов 10–60 п. н. и с числом повторов от 10 до 1500 на локус.

Микросателлиты с длиной повторов 2–6 п. н. и числом повторов 5–200 на локус.

При изучении частоты изменений в 2477 аутосомных микросателлитных локусах у членов 24832 семей Исландии было обнаружено 1953 *de novo* индел-мутаций, частота возникновения этих мутаций составляла  $3,31 \times 10^{-4}$  на локус. Если пересчитать эту частоту на количество микросателлитных локусов, то каждый ребенок нес примерно 1,6 *de novo* индел-мутаций. Это только по исследуемым 2477 микросателлитным локусам. Если в геноме человека ~1000 минисателлитных

и столько же микросателлитных локусов, то среднестатистический ребенок может нести по меньшей мере 10 *de novo* индел-мутаций. Следует отметить, что индел-мутации в структурных генах приводят к сдвигу рамки считывания.

Работы в рамках проекта дали первые оценки частоты *de novo* транспозиций, которая составила ~0,05 на геном. Только три транспозиции были обнаружены в генах. Ожидаемое число транспозиций в генах может быть более 130. Это свидетельствует о том, что подавляющее большинство транспозиций, затрагивающих структурные гены, убираются отбором до рождения ребенка.

Мутации, нарушающие копийность (CNVs), занимают значительную часть генома. Они, по последним оценкам, обнаружены более чем в 4 000 локусов хромосом человека и занимают приблизительно 20% всего генома.

Частоты возникновения *de novo* структурных хромосомных aberrаций в половых клетках человека изучены недостаточно. Но мы можем судить о частотах их возникновения, используя частоты их встречаемости в популяциях (табл. 1.3).

Таблица 1.3

**Основные типы хромосомных aberrаций  
и частота их встречаемости в популяции**

<b>Аберрации</b>	<b>Частота в популяциях</b>
Робертсоновские транслокации	1 на 1 000 или $10 \times 10^{-4}$
Реципрокные транслокации	1 на 625 или $16 \times 10^{-4}$
Терминальные делеции	Минимум 1 на 5 000 или $2 \times 10^{-4}$
Интерстициальные делеции	Минимум 1 на 4 000 или $2,5 \times 10^{-4}$
Интерстициальные транслокации	Минимум 1 на 4 000 или $2,5 \times 10^{-4}$
Прочие типы	на 2 000 или $5 \times 10^{-4}$

Приведенные в таблице цифры не отражают истинную частоту *de novo* хромосомных aberrаций. Часть из них убирается отбором, поэтому мы учитываем мутации только у живых людей. По разным оценкам предполагается, что частота структурных хромосомных aberrаций в гаметах, возникших *de novo*, может быть как минимум  $2 \times 10^{-3}$ .

**Зависимость частоты мутаций от пола.** Число клеточных делений (репликаций ДНК) в половых клетках мужчины основательно превышает таковую у женщин. Это является причиной того, что вклад отца в частоту *de novo* мутаций у ребенка в три раза превышает вклад матери. Для объяснения этого феномена рассмотрим различия процесса гаметогенеза у мужчин и женщин. У мужчин к моменту полового созревания сперматогонии проходят приблизительно 30 митотических делений. Клетки, возникающие при делении сперматогониев, превращаются в первичные сперматоциты и входят в мейоз I. В результате из первичных сперматоцитов возникают гаплоидные вторичные сперматоциты, которые проходят мейоз II и превращаются в сперматиды. Последние, созревая, теряют большую часть цитоплазмы, приобретают хвост и превращаются в зрелые сперматиды. Сперматогонии ежегодно делятся около 25 раз. Если к 20 годам мужчины сперматогонии делятся 150 раз, то к 40 годом — 610 раз. При таком большом числе делений и репликаций ДНК возрастает вероятность возникновения мутаций за счет ошибок репликации.

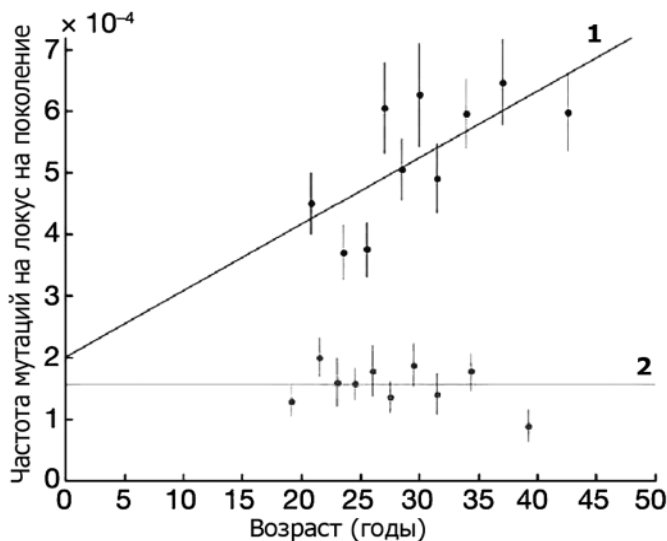


Рис.1.3. Зависимость частоты *de novo* индел-мутаций у ребенка в зависимости от возраста родителей:  
 1 — мутации, полученные от отца, 2 — мутации, полученные от матери  
 (Sun et al., 2012)

У женщин в первые несколько месяцев внутриутробного развития зародышевые клетки проходят 20–25 митотических делений и превращаются в оогонии. Начиная с плодного развития женского зародыша, оогонии превращаются в первичные ооциты, которые входят в мейоз I. К моменту рождения женского плода прекращается созревание первичных ооцитов и прохождение ими мейоза. Мейоз I завершается только к моменту овуляции, и в результате из первичного ооцита образуются вторичный ооцит и полярное тельце. Вторичный ооцит увеличивает объем цитоплазмы и клеточных органелл и вступает в мейоз II, который завершается после оплодотворения. В результате мейоза II образуется еще одно полярное тельце, а зрелая оплодотворенная яйцеклетка образует зиготу.

Влияние описанных различий в гаметогенезе у мужчин и женщин на частоту *de novo* индел-мутаций у ребенка показано на рис 1.3, из которого следует, что частота мутаций зависит от возраста отца, но не матери. Известно, что индел-мутации возникают в результате нарушения процесса репликации микросателлитной ДНК в клетках из-за «скольжения» ДНК-полимеразы в репликативной вилке.

#### 1.4. Индуцированные мутации

Индуцированные мутации возникают под действием мутагенов — разнообразных факторов, которые повышают частоту возникновения мутаций. Впервые индуцированные мутации были получены отечественными генетиками Г. А. Надсоном и Г. С. Филипповым в 1925 г. при облучении дрожжей излучением радия.

Различают несколько классов мутагенов:

- Физические мутагены: ионизирующие излучения, ультрафиолетовые лучи, тепловое излучение.
- Химические мутагены: аналоги азотистых оснований (например, 5-бромурацил), альдегиды, нитриты, алкилирующие агенты, гидроксилламин, ионы тяжелых металлов, некоторые лекарственные препараты и средства защиты растений.
- Биологические мутагены: мобильные генетические элементы, экзогенная ДНК, вирусы, противовирусные вакцины.

Механизмы мутагенного действия указанных факторов обсуждаются в последующих главах.

### 1.5. Множественные аллели и генетический полиморфизм

**Множественные аллели.** В одном и том же гене могут возникать разные мутации, тогда возникают *серии множественных аллелей*. Например, у дрозофилы ген  $w$  (*white*), определяющий окраску глаз, представлен последовательно доминирующими аллелями:  $w^+$  (темно-красные глаза)  $>$   $w^{ch}$  (вишневые)  $>$   $w^a$  (абрикосовые)  $>$   $w^{bf}$  (тускло-желтые)  $>$   $w$  (белые) и т. д. У кроликов ген, определяющий степень выраженности альбинизма, представлен последовательно доминирующими аллелями:  $C$  (нормальная, неальбинистическая окраска)  $>$   $c^{ch}$  (шиншилловая)  $>$   $c^h$  (горностаевая)  $>$   $c$  (альбинизм). У мышей ген, определяющий общую окраску тела, также представлен последовательно доминирующими аллелями:  $A^Y$  (желтая)  $>$   $A^L$  (агути со светлым брюхом)  $>$   $A$  (агути, норма)  $>$   $a^t$  (черная с подпалинами)  $>$   $a$  (черная). *Исходное, нормальное состояние аллеля традиционно называют диким типом* (часто обозначается символом «+»). Диким типом называют также нормальный генотип и нормальный фенотип. Сочетание двух мутантных аллелей одного и того же гена называют *компаундом*. Например, если при объединении в F1 двух мутаций возникает гибрид с мутантным фенотипом, то можно утверждать, что эти мутации повреждают один и тот же ген. В этом случае компаунд является гетероаллельной комбинацией.

**Генетический полиморфизм.** Множественный аллелизм является основой *генетического полиморфизма* в популяции, когда частоты даже наиболее редко встречающихся генотипов в популяциях превышают 1%. Изменения в нуклеотидной последовательности не обязательно проявляются в фенотипе. Некоторые мутации не оказывают никакого влияния на структуру и функцию соответствующего белка. Это фенотипически молчащие, *нейтральные мутации* — варианты генетического полиморфизма, которые не приводят к заменам аминокислот в пептидной цепи вследствие вырожденности генетического кода.

Полиморфизм типа однонуклеотидных замен (SNP) в геноме человека встречается с частотой 1 на 600–1200 п. н. Они представляют собой наиболее частую форму полиморфизма ДНК и могут быть использованы как маркеры конкретных участков генома человека. Полиморфизм не всегда представлен SNP. В геноме человека известны и другие типы полиморфизма. Например, полиморфизм числа копий триплетных повторов в гене *FMR1* (ломкая X-хромосома), делеции генов *GSTM1* и *GSTT1* (глутатион-S-трансфераза М и Т), дупликации гена *HBB2* (гемоглобин), инделы гена *APOE* (аполипопротеин Е).



Делеционный полиморфизм также часто встречается в геноме человека. По некоторым данным, человек в среднем гемизиготен примерно по 30–50 делециям размером более 5 тысяч п. н., в сумме занимающих более 550 тысяч п. н. и захватывающих более 250 известных генов.

Полиморфизм ДНК используется для разработки карт сцепления генов человека, для определения отличия нормальных хромосом от мутантных при генетической диагностике, для судебной медицины, определения отцовства, изучения эволюции генома, генетической истории народонаселения и во множестве других генетических исследований.

### 1.6. Классификации мутаций

Мутации классифицируют на основании различных критериев. Единой классификации мутаций не существует, а приводимые в литературе различные типы классификации являются условными.

Изменение нормального аллеля в мутантную форму называется *прямой мутацией* ( $A \rightarrow a$ ), а возврат мутантного аллеля к нормальному состоянию — *обратной мутацией*, или *реверсией* ( $a \rightarrow A$ ), но чаще реверсии возникают за счет супрессорных мутаций.

По возможности проявления в фенотипе различают *доминантные*, *полудоминантные* (неполное доминирование) и *рецессивные* мутации. Подавляющее большинство мутаций является рецессивными. Мутация считается доминантной, если она проявляется в гетерозиготном состоянии, и рецессивной, если это не так. Истинно доминантная мутация в гомозиготном и гетерозиготном состоянии фенотипически проявляет себя одинаково. Если гетерозигота фенотипически отличается от гомозиготы по доминантному аллелю, то это признак неполного доминирования.

Большинство рецессивных мутаций приводят к утрате функции и содержат крупные делеции, мутации со сдвигом рамки, нонсенс мутации и другие нарушения. Доминантные аллели, в отличие от рецессивных, приводят к усилению функции. Однако возможны доминантно наследуемые мутации с утратой функции, как в случаях доминантно наследуемых заболеваний. Например, синдром Марфана, который вызывается мутацией в гене *FBN1* фибриллина, который входит в состав межклеточного вещества соединительной ткани. Синдром проявляется системным поражением соединительной ткани из-за дефектного белка.

*Соматические мутации* не затрагивают половые клетки и не передаются потомкам. Проявление большинства мутантных генов в диплоидных соматических клетках маскируется нормальным доминантным аллелем, поскольку подавляющее большинство мутаций являются рецессивными.

*Генеративные мутации*, происходящие в гаметах или в тканях, образующих гаметы, передаются потомкам. При сочетании гамет с мутациями, затрагивающими один ген, образуются полностью мутантные (гомозиготные) организмы. Ауtosомно-доминантные мутации проявляются в фенотипе первого поколения. Ауtosомно-рецессивные мутации в мужских и женских гаметах могут оставаться незамеченными в течение нескольких поколений из-за гетерозиготности носителей. Х-сцепленные рецессивные мутации, возникшие в гаметах женского пола, могут проявиться у самцов F1.

Многие мутации, как отмечалось выше, не оказывают существенного влияния на жизнеспособность особей и не проявляются фенотипически (*нейтральные мутации*). Существуют мутации, приводящие к гибели организма (*летальные*) или заметно снижающие его жизнеспособность (*полуметальные*). В определенных условиях такие мутации могут повышать жизнеспособность организмов, как в случае с серповидноклеточной анемией. Гетерозиготность также может повышать жизнеспособность организмов, например, в случае явления гетерозиса.

Аллельные взаимодействия определяют все виды проявления мутации: доминирование, кодоминирование, неполное доминирование. В случае полного доминирования доминантный ген маскирует проявление рецессивного. Кодоминирование обычно проявляется на уровне белковых продуктов генов. Например, в системе наследования группы крови АВО доминантные аллели  $I^A$  и  $I^B$  в гетерозиготе проявляют кодоминирование, поскольку синтезируются оба антигена А и В, и формируют группу крови АВ. При скрещивании красноцветковых и белоцветковых растений львиного зева или ночной красавицы у гибридов F1 цветки имеют промежуточную розовую окраску — неполное доминирование.

По фенотипическому проявлению различают следующие мутации: *биохимические* (изменяется клеточный метаболизм); *онтогенетические* (нарушения онтогенеза); *физиолого-репродуктивные* (изменяется плодовитость); *анатомо-морфологические* (изменяется внутреннее и внешнее строение организмов); *этологические* (поведенческие).

В отдельный класс выделяют *динамические мутации*, или *мутации экспансии нуклеотидных повторов*. В их основе лежит увеличение

(экспансия) числа копий коротких повторяющихся последовательностей (CGG)<sub>n</sub>, (CTG)<sub>n</sub>, (CAG)<sub>n</sub> в кодирующих и регуляторных частях некоторых генов. Мутации такого типа зарегистрированы только у человека (более подробно они будут рассмотрены в главе 2).

По уровню организации генетического материала, затронутого изменением, все мутации делят на *генные*, *хромосомные* и *геномные* (рис. 1.4). В этой части классификации особенно заметно проявляется ее относительность. Так, хромосомные aberrации следует относить к мутациям с оговоркой, поскольку в их основе лежат процессы рекомбинации — особого типа генетических процессов. Аналогичным образом такая геномная мутация, как аллополиплоидия, произошла в результате отдаленной гибридизации, что только с натяжкой можно рассматривать как мутацию. Другие геномные мутации — автополиплоидия и анеуплоидия — произошли в результате нарушений в аппарате митоза или мейоза. Приведенная здесь классификация возникла в литературе достаточно давно и является традиционной, поэтому мы не стали ее менять, отдавая при этом себе отчет в ее условности.

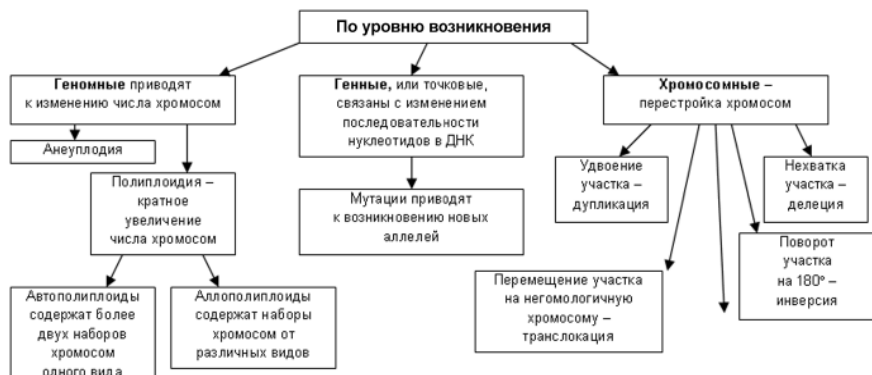


Рис. 1.4. Классификация мутаций по уровню возникновения

**Обратные и супрессорные мутации.** Возврат мутантного аллеля к нормальному состоянию может произойти за счет истинной обратной мутации в том же сайте гена, что и прямая мутация. Это приводит к восстановлению исходной нуклеотидной последовательности. Частота истинных обратных мутаций существенно ниже частоты прямых мутаций, поскольку последние могут возникнуть в различных сайтах данного

гена. Другая возможность восстановления дикого типа состоит в том, что дополнительная мутация компенсирует дефект, обусловленный первой мутацией, то есть супрессирует действие исходной мутации. Большинство обратных мутаций — супрессорные. Супрессия может быть двух типов: внутригенная и внегенная. Явление внутригенной супрессии обнаружил в 1967 г. Ч. Яновский при изучении мутаций в гене триптофансинтетазы *E.coli*. Замена глицина (CGA) в положении 210 на аргинин (AGA) в результате миссенс-мутации инактивирует фермент. Вторая мутация, вызывающая замену кодона AGA на AGU (или AGG), приводит к включению в белок серина вместо аргинина. Происходит восстановление активности фермента, хотя это не является истинной реверсией.

Внутригенная супрессия распространена и в мутациях со сдвигом рамки считывания (фреймшифт-мутациях). Именно взаимодействие мутаций типа вставки или выпадения пары оснований в ДНК одного гена было использовано Ф. Криком с сотрудниками еще в 1961 г. для доказательства триплетности генетического кода. Ими была получена коллекция *rII*-мутантов бактериофага Т 4, индуцированных профлавином, который вызывает мутации сдвига считывания. Был проведен анализ аминокислотного состава белковой оболочки *rII*-мутантов, а также их ревертантов, поскольку *rII*-мутанты бактериофага Т 4 несут изменения в гене, контролирующем образование этого белка. Целью такого анализа была проверка предположения, что если прямая мутация выражается в выпадении пары оснований, то происходит сдвиг считывания кода вправо от этой мутации, принимая, что код всегда считывается слева направо. Если вблизи от точки прямой мутации в том же гене происходит вторая мутация — вставка пары оснований, то она служит внутригенным супрессором по отношению к прямой мутации, так как при этом происходила нормализация считывания вправо от вставленной пары оснований. Результаты анализа показали, что, хотя и образуются полноценные фаговые частицы, участок полипептида, кодируемый участком гена, заключенным между выпадением и вставкой, оказался полностью отличным по аминокислотному составу от аналогичного полипептидного участка в белке фага дикого типа. Это возможно только в том случае, если участок полипептидной цепи, остающийся измененным, не играет существенной роли в функционировании всей белковой молекулы. Таким образом, было доказано, что внутригенная супрессия осуществляется на уровне считывания генетического кода.

Внегенная супрессия миссенс-мутаций является результатом мутаций в гене тРНК, меняющих состав антикодона. Мутантная тРНК может включить в синтезирующуюся полипептидную цепь напротив нонсенс-кодона аминокислоту, синтез белка не будет прерван (супрессия нонсенс-мутаций).

*Литература:*

- Иванов В.И. и др.* Генетика. М., ИКЦ «Академкнига», 2006. С. 104–115.
- Инге-Вечтомов С.Г.* Генетика с основами селекции. Изд-во Н-Л, Санкт-Петербург, 2010. С. 525–537.
- Жимулев И. Ф.* Общая и молекулярная генетика: Учеб. пособие. Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2003. С. 51–80.
- Luria S.E., Delbrück M.* Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance // Genetics. 1943. V. 28. P. 491–511.
- Sun J.X., Helgason A., Masson G. et al.* A direct characterization of human mutation based on microsatellites // Nat. Genet. 2012. V.44. N10. P. 1161–1165.

## Глава 2

### ГЕННЫЕ МУТАЦИИ

Генные мутации представляют собой изменения нуклеотидной последовательности ДНК в пределах отдельного гена. Эти мутации можно разделить на две группы: точковые и структурные.

#### 2.1. Точковые мутации

В том случае, когда изменение затрагивает лишь один или несколько нуклеотидов, говорят о *точковых* мутациях. По своей молекулярной природе точковые мутации делятся на две группы: *мутации замены пар оснований* и *мутации со сдвигом рамки считывания*.

**Мутации типа замены оснований (нуклеотидные замещения)** делятся на два класса: *транзиции* и *трансверсии*. Транзиции заключаются в замене одного пурина на другой пурин (аденин ↔ гуанин) или пиримидина на пиримидин (цитозин ↔ тимин). Трансверсии — в замене пурина на пиримидин или наоборот (цитозин/тимин ↔ аденин/гуанин).

Замены нуклеотидных пар в молекуле ДНК приводят к следующим генетическим последствиям:

1. Изменение смысла кодона, приводящее к замене аминокислоты в соответствующем месте полипептидной цепи (*миссенс-мутация*).

2. Сохранение смысла кодона благодаря вырожденности генетического кода (*синонимичная мутация*). Вырожденность кода: все аминокислоты, кроме метионина и триптофана, кодируются не одним, а двумя, тремя и более кодонами.

3. Образование бессмысленного кодона (*nonsense*), вызывающего преждевременную терминацию трансляции (*нонсенс-мутация*). В связи с этим другое их название — стоп-кодона. В генетическом коде имеются три бессмысленных кодона: UAG — амбер, UAA — охра и UGA — опал. Соответственно, мутации, приводящие к образованию бессмысленных триплетов, называются амбер-, охра- и опал-мутациями. Нонсенс-мутации чаще летальны или условно-летальны у бактерий. В оперонах бактерий

они снижают активность всех генов, расположенных ниже инактивированного гена по направлению транскрипции.

4. Обратная замена (стоп-кодон на смысловой кодон).

Вышеуказанные типы мутаций можно охарактеризовать на примере замены пар оснований в гене гемоглобина человека.

Замена аминокислотного остатка в составе полипептида (миссенс-мутации). В состав молекулы гемоглобина человека входят две  $\alpha$ -цепи ( $\alpha$ -цепь кодируется геном в хромосоме 16) и две  $\beta$ -цепи ( $\beta$ -цепь — геном в хромосоме 11). В состав  $\beta$ -цепи входит 146 аминокислот, при этом в нормальной  $\beta$ -цепи шестым аминокислотным остатком является глутаминовая кислота, кодируемая триплетом GAA. Если в результате мутации в ДНК произойдет замена триплета GAA на триплет GTA, то на месте глутаминовой кислоты в молекуле гемоглобина появится валин. В итоге вместо нормального гемоглобина HbA появится его новая форма — HbS. Такая замена всего лишь одного нуклеотида и, соответственно, одной аминокислоты приводит к изменению функции гемоглобина и развитию тяжелого заболевания — *серповидноклеточной анемии*.

Эритроциты у таких больных приобретают форму серпа и теряют способность к нормальному транспорту кислорода. Лица, гомозиготные по данной мутации, умирают в раннем детстве. Зато гетерозиготы характеризуются слабо измененными эритроцитами и повышенной устойчивостью к малярии. Поэтому в тех регионах планеты, где свирепствует малярия (например, в Африке), отбор действует в пользу таких гетерозигот. Таким образом, серповидноклеточная анемия — это пример относительности понятий «полезные» и «вредные» мутации.

Мутация без замены аминокислотного остатка в составе полипептида (сэймсенс-мутации). Если в участке ДНК, кодирующей  $\beta$ -цепь гемоглобина, произойдет замена триплета GAA на триплет GAG, то из-за вырожденности генетического кода замены глутаминовой кислоты не произойдет. В итоге структура  $\beta$ -цепи гемоглобина не изменится, и в эритроцитах будет обнаруживаться только нормальный гемоглобин HbA. Таким образом, вовсе не любая генная мутация проявляется в фенотипе.

Полногеномное секвенирование геномов членов семей в трех поколениях показало, что частота *de novo* мутаций замены пар нуклеотидов у ребенка составляет  $1,2 \times 10^{-8}$ . При этом нуклеотидные замещения неравномерно распределены по геному. Частота транзиций в CpG-островках в 10 раз превышает среднюю частоту по геному (табл. 2.1).

Таблица 2.1

**Распределение нуклеотидных замещений в CpG-островках  
и на участках генома без CpG-островков**

Тип мутаций	Число мутаций	Частота мутаций
Транзиции в последовательностях без CpG-островков	2,486	$6,18 \times 10^{-9}$
Транзиции в CpG-островках	855	$1,12 \times 10^{-7}$
Трансверсии в последовательностях без CpG-островков	1,516	$3,76 \times 10^{-9}$
Трансверсии в CpG-островках	73	$9,59 \times 10^{-9}$
<b>Всего</b>	4,933	$1,20 \times 10^{-8}$

*Примечание:* CpG-островки имеют длину более  $> 200$  п. н., длина большинства — 0,5–3 т. п. н. Островки имеют относительно высокий GC-состав ( $> 50$ , обычно  $> 60\%$ ), характеризуются плотным расположением мотива CpG (один на 10 п. н., что в 10–20 раз выше, чем в среднем по геному).

**Мутации со сдвигом рамки считывания (*фреймишфт-мутации*)**

составляют значительную долю всех спонтанных мутаций и происходят в результате вставки или потери нуклеотидных пар. При этом рамка считывания нарушается и может возникнуть нонсенс-кодон, что приведет к прерыванию трансляции и образованию укороченного полипептида. Если после вставки пары нуклеотидов на небольшом расстоянии произойдет выпадение пары нуклеотидов (и, наоборот, после выпадения пары нуклеотидов произойдет вставка пары нуклеотидов), то кодирующая способность рамки может восстановиться. В таких случаях две мутации хотя бы частично компенсируют друг друга (внутригенная супрессия).

Мутации со сдвигом рамки считывания составляют ~80% от всех генных мутаций.

*Нонсенс-мутации* составляют особую группу генных мутаций, поскольку они приводят к появлению стоп-кодонов. Эти мутации могут возникать вследствие как замены нуклеотидных пар, так и потерь или вставок. Когда аппарат трансляции встречает стоп-кодон, синтез полипептида обрывается.



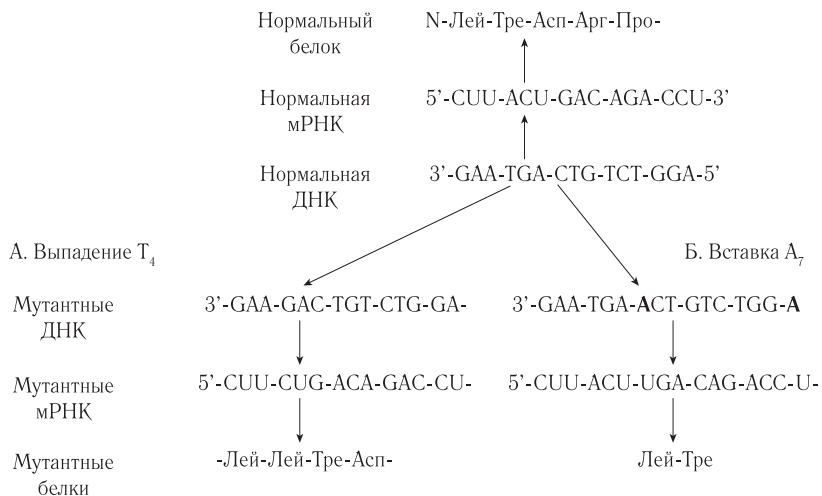


Рис. 2.1. Вставка и потеря нуклеотидных пар и их последствия

Выпадение T<sub>4</sub> во втором триплете приводит к тому, что на месте триплета TGA, кодирующем треонин, появляется GAC, кодирующий лейцин, и т. д. При вставке A<sub>7</sub> в третий триплет возникает сдвиг рамки считывания: триплет CTG становится ACT, кодирующим лейцин, триплет TCT заменяется на GTC и т. д.

*Слайсинговые мутации* на стыках экзонов и интронов приводят либо к неправильному вырезанию интрона (сохранению его в составе транскрипта), либо к удалению из молекулы мРНК информационно значимой экзонной последовательности. Всё это приводит к существенному нарушению структуры белка, особенно при сдвиге рамки считывания из-за нарушения связи экзон — интрон. Например, такая мутация в гене эксцизионной репарации *XPA* является причиной тяжелой формы пигментной ксеродермы у человека.

*Регуляторные мутации* связаны с нарушениями в регуляторных областях гена. Большинство мутаций, затрагивающих регуляторные области, выявляют в консервативных последовательностях промоторных районов. Они не приводят к изменениям структуры и функции белков. Фенотипическое проявление таких мутаций определяется пороговым уровнем концентрации белка, при котором еще обнаруживается его активность. Этот тип мутаций остается пока наименее изученным, и, возможно, часть не выявляемых в ряде патологий мутаций относится к этому типу.

Некоторые мутации обладают плейотропным действием, т. е. приводят к одновременному изменению нескольких признаков. Например, хоризмовая кислота является предшественником в биосинтезе ароматических аминокислот — триптофана, фенилаланина. Если мутация блокирует хотя бы один этап синтеза хоризмовой кислоты, то клетка (организм) утрачивает способность к синтезу сразу всех трех веществ.

## 2.2. Структурные генные мутации

**Инсерции и делеции.** Наиболее простыми типами структурных генных мутаций являются инсерции или делеции части или всего гена, получившие в англоязычной литературе название *индел-мутации* (от англ. *insertions & deletions — indel*). Под индел-мутациями подразумевают вставки и делеции от 3 до 1000 п. н. Мелкие делеции и вставки могут привести к фреймшифт-мутациям, а также компенсировать друг друга (супрессия). Однако протяженные делеции приводят к тяжелым заболеваниям. Например, крупные делеции (более 100 п. н.) отмечены у 5% больных гемофилией А, вызванной мутациями в гене фактора свертывания крови VIII. Описано более 70 крупных делеций в этом гене, которые захватывают как ген целиком, так и отдельные его экзоны.

**Динамические мутации.** К структурным мутациям гена относятся и *динамические мутации*, открытые в 1990-е гг. и зарегистрированные только у человека. Они представляют собой увеличение числа тандемно повторяющихся тринуклеотидных последовательностей, локализованных в кодирующих или регуляторных областях определенных генов.

По количеству тринуклеотидных повторов такие гены характеризуются высоким уровнем полиморфизма. Обычно их количество поддерживается на стабильном уровне и не нарушает нормальной функции гена. Однако их число может превысить определенный критический уровень, и тогда развивается заболевание, сопровождающееся нарастанием тяжести клинических проявлений в последующих поколениях (так называемая антиципация).

Классическим примером мутации этого типа является синдром ломкой хромосомы (*Fra XA*), при которой выявляется область повторов CGG в регуляторной области гена *FMR-1* (Xq27.3). В норме число повторов в этом гене варьирует от 6 до 54 (у большинства аллелей — 29). Хромосомы, содержащие 50–200 повторов, считаются премутацией. В следующем

поколении число повторов может увеличиться до 300, что и обуславливает выраженную клиническую картину заболевания.

В основе механизма возникновения индел-мутаций, включая экспансии тринуклеотидных повторов, лежит нарушение процесса репликации микросателлитной ДНК в соматических и генеративных клетках, прежде всего так называемое скольжение (*slippage*) в репликативной вилке. Если аппарат репликации ДНК проходит участок, включающий пять или более повторов одного или двух-трех нуклеотидов, ДНК-полимераза может «заскользнуть» по одной из матричных цепей, формируя одноцепочечную петлю. Эта петля может на какое-то время стабилизироваться, а репликация — продолжиться. Тогда, в зависимости от того, в какой из цепей возникла петля, произойдет уменьшение или увеличение числа повторов в продукте репликации (рис. 2.2). Понятно, что чем больше повторов имеется в ДНК, тем более она нестабильна и склонна к дальнейшему изменению числа повторов в последующих клеточных поколениях, что объясняет прогрессирующий характер заболеваний этого типа.

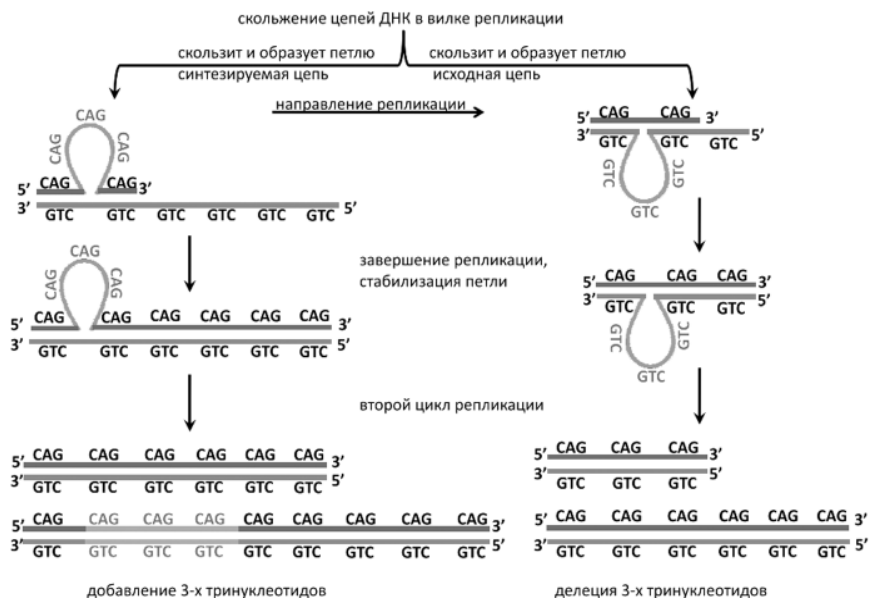


Рис. 2.2. Механизм экспансии тринуклеотидных повторов

Для всех динамических мутаций характерно поражение головного мозга, особенно подкорковых структур, что сопровождается, помимо других симптомов, различной степенью слабоумия. Тяжесть заболевания и его начало коррелирует с числом повторов. Список болезней экспансии, вызванных динамическими мутациями, превысил два десятка нозологических форм и продолжает постоянно пополняться. Примеры подобных болезней приведены в табл. 2.2.

Для части из них (синдром ломкой X-хромосомы, миотоническая дистрофия) типична передача по материнской линии. Другие, как, например, хорея Хантингтона, передаются преимущественно по отцовской линии. Причиной повреждающего действия одних динамических мутаций является утрата функции вследствие блокирования генной экспрессии, других — появление белковых продуктов, аномальная структура которых оказывает негативное действие на жизнеспособность или функционирование клеток.

Таблица 2.2

**Примеры болезней,  
связанных с экспансией тринуклеотидных повторов**

	Тринуклеотидные повторы	Число в норме	Число у больных	Тип наследования
Болезнь Хантингтона	CAG	6–35	36–120	аутосомно-доминантный
Миотоническая дистрофия	CTG	5–35	> 200	аутосомно-доминантный
Синдром ломкой хромосомы	CGC	6–50	> 200	X-сцепленный доминантный
Спинабульбарная мышечная атрофия	CAG	10–30	35–60	X-сцепленный доминантный

**Вариации числа копий.** Структурные изменения генов и отдельных сегментов генома размером от одной тысячи до миллионов п. н. принято классифицировать как вариации числа копий — **CNV** (англ. *copy number variation*). Снижение или повышение числа копий определенного гена

может привести к пониженной или повышенной экспрессии продукта гена — белка или некодирующей РНК. Влияние числа копий гена на фенотип было отмечено еще в 1930-х гг., в частности, было показано, что дупликация гена *Bar* у дрозофилы вызывает сужение глаз, или *Bar*-фенотип.

В геноме человека описаны более 4 000 участков CNV, причем 613 из них размером около  $10^6$  п. н. Частота *de novo* CNV у человека варьирует от  $2,5 \times 10^{-6}$  до  $1 \times 10^{-4}$  на локус на поколение в зависимости от локуса и размера CNV. Вариации числа копий генов могут привести к аутизму, трудностям в обучении и предрасположенности к шизофрении. Так, полногеномное исследование членов около 400 семей (тройки отец и дети) показало, что частота участков CNV размером более 100 т. п. н. составляет  $1,2 \times 10^{-2}$ . При этом у индивидов с нейрокогнитивными расстройствами частота CNV была в три раза выше, чем у нормальных индивидуумов, —  $3,6 \times 10^{-2}$ .

Список полиморфных CNV с частотами и генами в зоне их влияния представлен в базе *Date base of genomic variants* (URL: <http://projects.tcag.ca/variation>). Анализ исследований встречаемости CNV в геноме человека показывает следующее:

- CNV затрагивают более 3 000 действующих генов и 20 % генома. Для 800 CNV полиморфизм превышает 3 %.
- За счет делеционного полиморфизма два человека могут отличаться по длине генома на 20 Мб.
- Два человека в среднем отличаются по числу копий со средним размером 20 т. п. н. в 250 локусах.
- Люди отличаются друг от друга в большей степени структурными вариациями генома, чем нуклеотидным составом.

В качестве примера на рис. 2.3 приведена локализация 1 447 участков CNV в хромосомах человека. Видно, что эти участки отличаются друг от друга как по размерам, так и по частоте полиморфных вариантов.

Для выявления CNV в геноме разработан метод сравнительной геномной гибридизации (CGH — *comparative genomic hybridization*). Для проведения CGH используют ДНК из исследуемого образца, например, из опухолевой ткани, и контрольная ДНК. Их метят различными флуорохромами, например, исследуемую ДНК зеленым цветом, а контрольную — красным. После чего проводят их гибридизацию с метафазными хромосомами на предметном стекле. Если в результате гибридизации данный участок в опухолевой ДНК окажется увеличенным, то соответствующий

регион в нормальных метафазах станет преимущественно зеленым, а если регион в исследуемой ДНК отсутствует, то соответствующий регион станет красным. Соотношение флуоресценции разных цветов по длине хромосомы определяют количественно с использованием цифровых систем анализа. Вставки в исследуемой ДНК видны как хромосомные районы с повышенным коэффициентом флуоресценции, тогда как делеции приводят к уменьшению этого коэффициента.

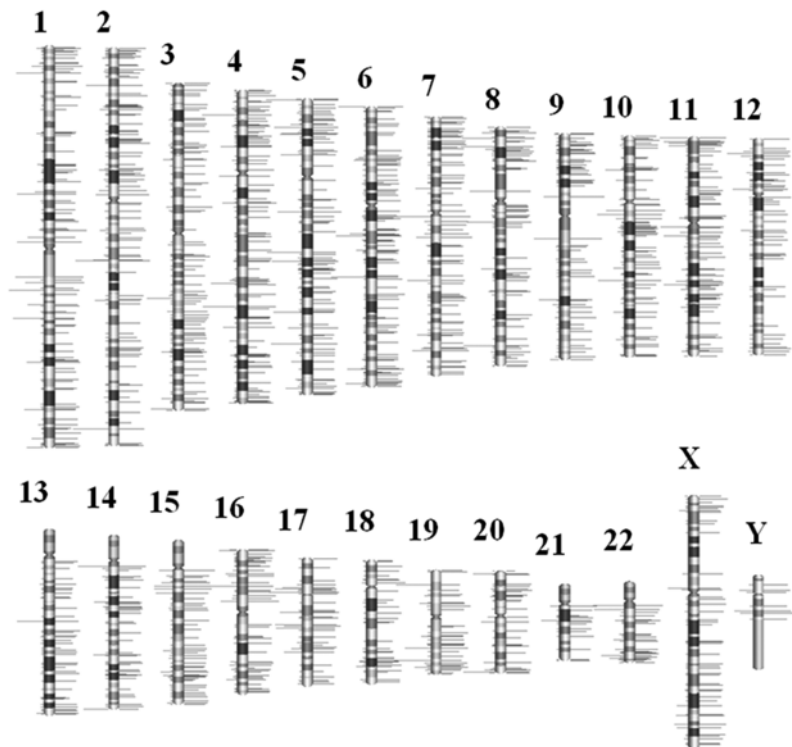


Рис. 2.3. Хромосомная локализация 1447 участков CNV у человека

На левой стороне изображений хромосом приведена частота полиморфных вариантов в логарифмическом масштабе, справа — размер зоны SNV в логарифмическом масштабе.

В настоящее время для CGH вместо метафазных хромосом используют биочипы, представляющие собой матрицу со множеством точно нанесенных фрагментов ДНК или массива олигонуклеотидов,

перекрывающих весь геном. Такой метод получил название матричной CGH, где, как и при стандартном методе, исследуемый и нормальный геномы метят разными флуорохромами. Гибридизацию ДНК-проб, в отличие от стандартного метода, проводят не на метафазной пластинке, на биочипе (рис. 2.4).

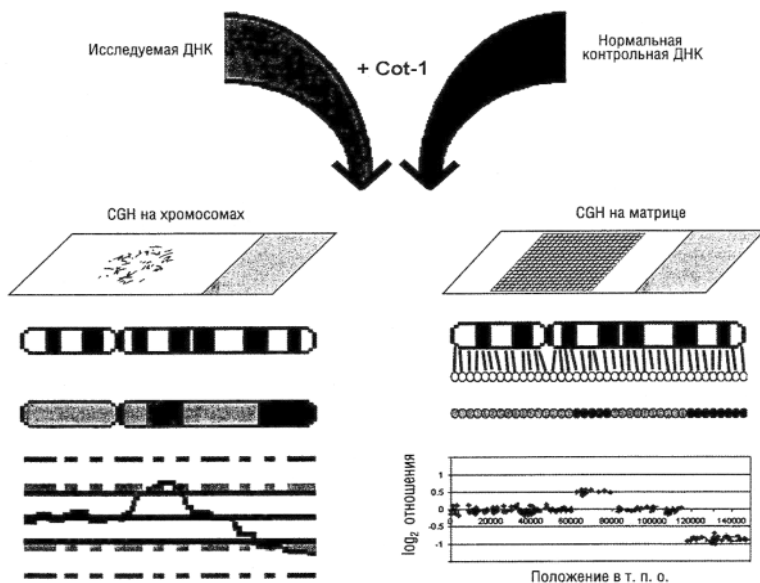


Рис. 2.4. Схема эксперимента по сравнительной геномной гибридизации (CGH)  
Слева показана CGH на хромосомах, справа — на матрицах (биочипах)

Затем матрицу сканируют специальным прибором и определяют относительную интенсивность флуоресценции каждого клона, что позволяет вычислить коэффициент интенсивности, пропорциональной числу копий. Разрешение анализа ограничивается только размерами клонов и числом клонов в массиве.

В настоящее время доступно множество различных вариантов матриц как для анализа всего генома, так и для подробного исследования его отдельных участков. Количество описываемых в разных исследованиях CNV зависит от разрешающей способности биочипов, использованных для их обнаружения.

### 2.3. Причины возникновения генных мутаций

Различают спонтанные и индуцированные мутации.

*Спонтанные (самопроизвольные)* мутации возникают без видимых причин, их принято рассматривать как результат ошибок генетических процессов: репликации, репарации и рекомбинации ДНК. Это означает, что процесс возникновения новых мутаций находится под генетическим контролем организма. Например, известны гены-мутаторы и гены-антимутаторы, которые повышают или понижают частоту других мутаций.

Можно выделить три фактора, приводящие к спонтанным мутациям: наличие *таутомерных форм* оснований ДНК, спонтанное дезаминирование метилированных цитозиновых и окисление гуаниновых нуклеотидов.

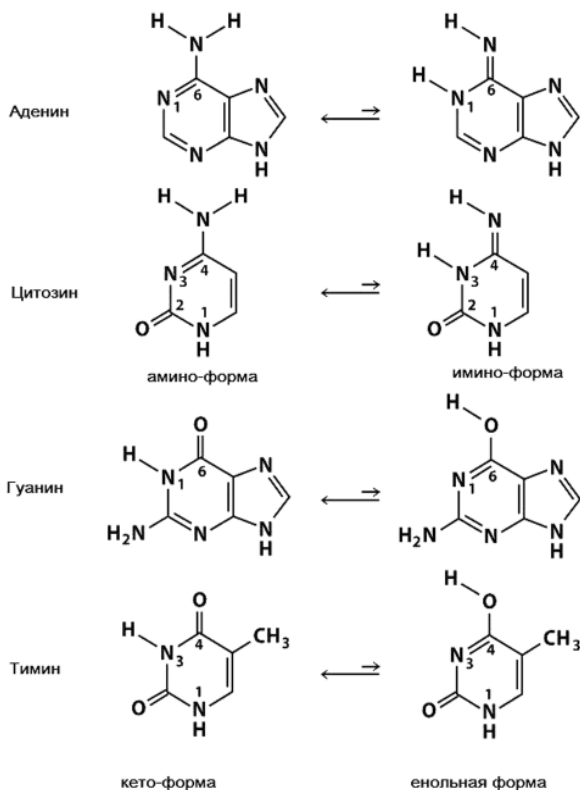


Рис. 2.5. Нормальные и таутомерные формы азотистых оснований ДНК



Главной причиной ошибок репликации является существование оснований ДНК в различных *таутомерных формах* (рис. 2.5). Например, аденин в редкой иминоформе спаривается с цитозином, а не с тимином, что при последующей репликации приводит к транзиции АТ → ГС. Другая причина — неисправленные ДНК-полимеразой ошибки репликации.

Ошибки в работе ДНК-полимераз приводят к неправильной вставке с частотой 1 на  $10^5$  нуклеотидов. Однако корректорская 3'-5'-экзонуклеазная активность ДНК-полимераз снижает эту частоту до 1 на  $10^{10}$  нуклеотидов.

Дезаминирование метилированного цитозина превращает его в тимин. Метилирование ДНК — распространенная эпигенетическая модификация, в результате которой динуклеотиды CpG избирательно модифицируются. Однако метилцитозин отличается нестабильностью, и может произойти его спонтанное дезаминирование, которое превращает его в тимин (рис. 2.6).

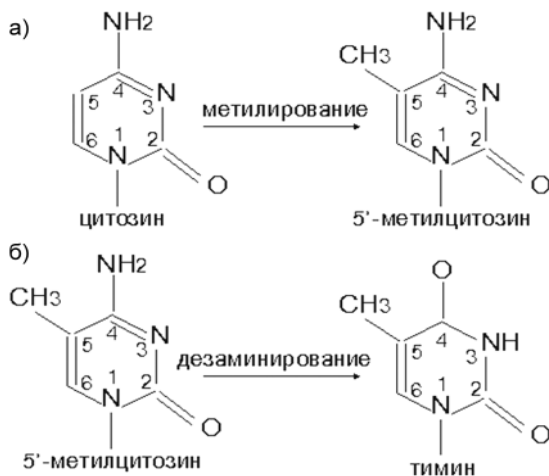


Рис. 2.6. Спонтанное дезаминирование метилцитозина  
а) этап метилирования; б) этап дезаминирования

Из-за тепловых флуктуаций в каждой клетке человека ежедневно происходит примерно 100 реакций дезаминирования метилированного цитозина. В результате дезаминирования метилцитозина в ДНК появляется дефект (неспаренные основания G–Т), который индуцирует систему

репарации. Разрешение ситуации может быть двояким: восстановление последовательности дикого типа (т. е. пары G–C) или возникновение мутации при следующей репликации (замена пары G–C на A–T) (рис. 2.7). Хотя ферменты репарации с большей вероятностью удаляют тимин и восстанавливают исходную последовательность, мутации тем не менее возникают очень часто, особенно в последовательностях с CpG-островками. Известно, что частота спонтанных транзиций в CpG-островках в 10 раз превышает среднюю частоту по геному (табл. 2.1). Надо полагать, в этом факте есть и вклад мутаций, возникших в результате дезаминирования метилированного цитозина.

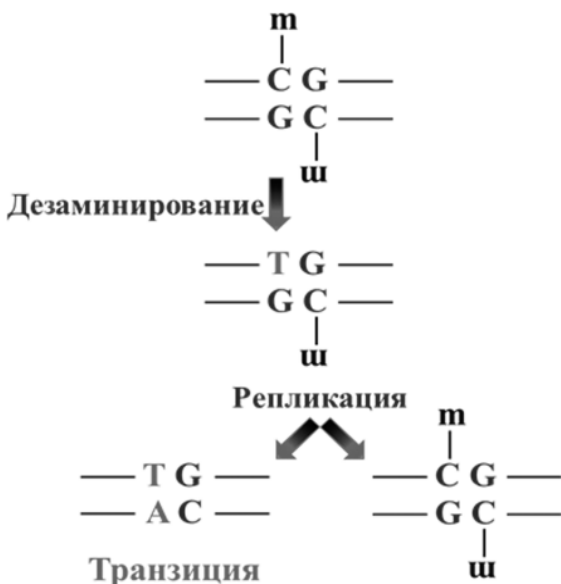


Рис. 2.7. Транзиция GC → AT  
в результате дезаминирования метилированного цитозина

Окисление гуанина происходит свободными радикалами кислорода. Клетка за один день поглощает  $10^{12}$  молекул кислорода, из которых около 1% превращаются в свободные радикалы (активные формы кислорода, АФК), способные модифицировать ДНК. За одни сутки 20 тыс. нуклеотидов повреждаются свободными радикалами. При окислении свободными радикалами гуанин превращается в 8-оксигуанин (рис. 2.8).

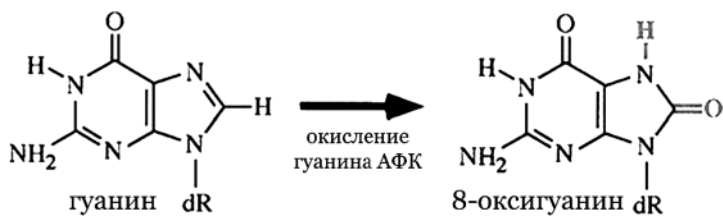


Рис. 2.8. Окисление гуанина свободными радикалом кислорода

Последний в процессе репликации присоединяет вместо цитозина тимин, в результате чего пара GC в молекуле ДНК замещается парой AT (рис. 2.9).

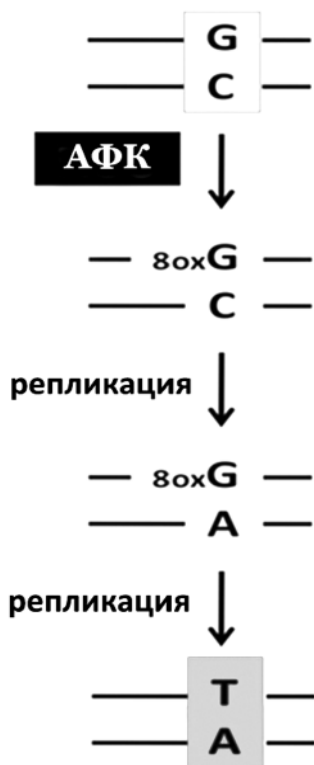


Рис. 2.9. Транзиция GC → AT в результате окисления гуанина в 8-оксигуанин

Немаловажную роль играют нарушения систем репарации. Например, мутации в гене *uvrD* у *E.coli* повышают частоту спонтанных транзиций АТ → GC в десятки раз.

Неаллельная (эктопическая) гомологичная рекомбинация является основной причиной возникновения индел-мутаций и CNV.

Важным источником спонтанного мутагенеза является перемещение мобильных генетических элементов, механизмы которого будут рассмотрены в главе 4.

На спонтанный мутагенез существенно влияют следующие структурные факторы: наличие прямых и обратных повторов, высокая концентрация GC-пар, образующих горячие точки мутирования.

*Индукцированные мутации* могут быть вызваны физическими (ионизирующая радиация, ультрафиолетовое облучение) и химическими мутагенами. При этом мутации возникают не сразу. Сначала под воздействием мутагенов возникает *предмутационное повреждение* ДНК. Различные репарационные системы стремятся устранить повреждение, и тогда мутация не реализуется. Однако при большом числе повреждений репарационные системы могут не справиться с их устранением. У бактерий в этом случае индуцируются неточные (мутагенные) системы репарации, которые осуществляют превращение предмутационных повреждений ДНК в фиксированные мутации. Основу репарационных систем составляют различные ферменты, закодированные в геноме клетки. Таким образом, мутагенез находится под генетическим контролем клетки; это не чисто физико-химический, а биологический процесс. Механизмы репарации повреждений ДНК рассматриваются в главе 9.

#### 2.4. Методы выявления и количественного учета генных мутаций

Сложность выявления генных мутаций связана, во-первых, с рецессивностью большинства мутаций, а во-вторых с летальностью многих из них.

Многочисленные методы выявления генных мутаций можно разделить на две основные группы: генетические и молекулярно-генетические методы.

**Генетические методы** основаны на скрещивании возможных носителей мутации с тестерными линиями (линиями-анализаторами). Самый простой подход — это скрещивание носителей предполагаемой мутации с особями соответствующей рецессивно-гомозиготной линии, т. е. обычное анализирующее скрещивание.

*Метод учета мутаций в специфических локусах у мышей.* Используют специальные анализаторные линии мышей, с помощью которых могут быть выявлены мутации: не-агути (*a*), коричневый (*b*), альбинос (*c*), пегий (*s*), светло-розовые глаза (*p*), светлый мальтийский (*d*), короткое ухо (*se*). Они локализованы на пяти различных хромосомах, причем локусы *p* и *c* являются сцепленными, так же как локусы *d* и *se*. При скрещивании испытуемого самца, предполагаемого носителя мутации, с самками тестерной линии, гомозиготной по рецессивным аллелям перечисленных генов, в гетерозиготном потомстве F1 фенотипически проявляется индуцированная рецессивная мутация одного из этих генов.

*Метод учета рецессивных, сцепленных с полом летальных мутаций у дрозофилы.* Используется созданная Г. Мёллером (1927) тестерная линия М-5 (Мёллер-5). X-хромосома самок этой линии маркирована мутациями *V* (полосковидные глаза) и  $w^a$  (абрикосовые глаза) и содержит две инверсии, препятствующие прохождению кроссинговера. Самки М5 гомозиготны по мутантной хромосоме.

Для выявления мутаций используются самцы дикого типа с нормальными X-хромосомами (аллели  $V^+$  и  $w^+$  — нормальная структура хромосомы, нормальные буро-красные глаза), которых подвергают воздействию тестируемым мутагеном. В результате в какой-то части X-хромосом в половых клетках самцов могут возникнуть рецессивные летальные мутации.

Обработанных испытуемым агентом самцов скрещивают с самками М-5. В F1 все самки имеют полосковидные (мутация *Var* является полудоминантной) буро-красные глаза, а самцы — абрикосовые полосковидные глаза. Часть самок получает от отцов по нормальной X-хромосоме, а часть — по X-хромосоме с рецессивной леталью. Все самцы получают от матерей М-5 только немутантные хромосомы с аллелями *V* и  $w^a$ . В F1 рецессивные мутации у самок, даже если они есть, не проявляют летального эффекта, поскольку они находятся в гетерозиготном состоянии.

Затем гибриды первого поколения скрещивают между собой, и потомство каждой самки выращивают в отдельной пробирке. Часть самок получают от отца немутантную X-хромосому дикого типа, и в их потомстве обнаруживаются немутантные самцы дикого типа. Однако некоторая часть самок несет возникшую в X-хромосоме дикого типа рецессивную летальную мутацию; соответственно, их сыновья, унаследовавшие такие хромосомы, не выживают, и самцы дикого типа в потомстве самок-носительниц не обнаруживаются (рис. 2.10).

Исследуют не менее 1000 пробирок F<sub>2</sub>, при этом число пробирок равно числу анализируемых X-хромосом. Частоту летальных мутаций рассчитывают путем деления числа пробирок, не содержащих самцов дикого типа, на общее число проанализированных пробирок. Например, из 1000 пробирок в 31 не обнаружено самцов дикого типа. В таком случае частота летальных мутаций составит:  $31/1000 \times 100\% = 3,10\%$ .

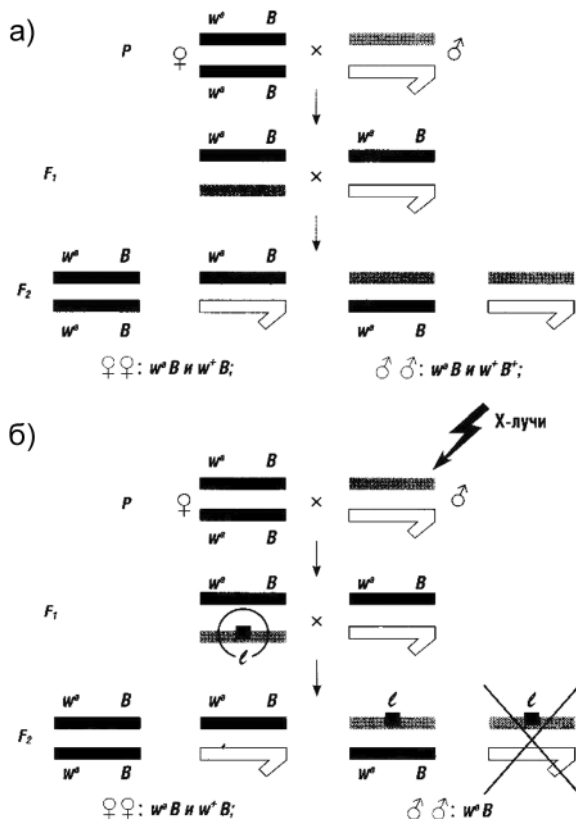


Рис. 2.10. Схема выявления и количественного учета рецессивных, сцепленных с полом летальных мутаций у дрозофилы (метод Мёллер-5)

- а) расщепление по фенотипу в F<sub>2</sub> в случае отсутствия рецессивной летали в анализируемой X-хромосоме; б) расщепление по фенотипу в F<sub>2</sub> в случае возникновения рецессивной летали в анализируемой X-хромосоме [по Инге-Вечтомов, 2010]

Г. Мёллер использовал в своих экспериментах рентгеновские лучи. В настоящее время этот метод используют также для определения мутантной активности химических соединений

**Биохимические и молекулярно-генетические методы выявления мутаций** разнообразны и основаны на применении различных подходов:

1. Метод селективных сред используется для выявления определенных биохимических продуктов мутантных генов. Например, у микроорганизмов и в культурах животных и растительных клеток на селективных питательных средах выявляются ауксотрофные мутанты, не способные синтезировать определенные вещества (по сравнению с нормальными, прототрофными формами), или клетки, устойчивые к селективному агенту.

2. Методы, основанные на непосредственном выявлении измененных нуклеиновых кислот и белков с помощью гель-электрофореза в сочетании с другими методиками.

3. Секвенирование ДНК, несущей мутацию.

4. Метод сравнительной геномной гибридизации (CGH, *comparative genome hybridation*) для выявления CNV в геноме.

## 2.5. Номенклатура генных мутаций

В 1996 г. была принята система записи различных типов мутаций, которая рассчитана как на запись аминокислотных замен в белках, так и на нуклеотидные замены и перестановки в ДНК. В первом случае каждой аминокислоте соответствует однобуквенный символ (табл. 2.3), слева записывается нормальный вариант аминокислоты, справа — мутантный, а расположенный в центре номер соответствует месту замены в цепочке первичного продукта трансляции.

Таблица 2.3

**Обозначение аминокислотных остатков**

Трехбуквен. обозначение	Аминокислота	Однобуквен. обозначение	Трехбуквен. обозначение	Аминокислота	Однобуквен. обозначение
Ala	Аланин	(A)	Leu	Лейцин	(L)
Arg	Аргинин	(R)	Lys	Лизин	(K)

Трехбуквен. обозначение	Аминокислота	Однобуквен. обозначение	Трехбуквен. обозначение	Аминокислота	Однобуквен. обозначение
Asn	Аспарагин	(N)	Met	Метионин	(M)
Asp	Аспарагиновая кислота	(D)	Phe	Фенилаланин	(F)
Cys	Цистеин	(C)	Pro	Пролин	(P)
Gln	Глутамин	(Q)	Ser	Серин	(S)
Glu	Глутаминовая кислота	(E)	Thr	Треонин	(T)
Gly	Глицин	(G)	Trp	Триптофан	(W)
His	Гистидин	(H)	Tyr	Тирозин	(Y)
Ile	Изолейцин	(I)	Val	Валин	(V)

Например, запись N44G означает замену аспарагина на глицин в 44-м положении полипептидной цепи, а A655Q — аланина на глутамин в положении 655 белкового продукта. Так записываются различные варианты аминокислотных замен при миссенс-мутациях. Место остановки синтеза полипептидной цепи при нонсенс-мутациях обозначается буквой X.

В случае делеции или инсерции одного или двух нуклеотидов приводится их буквенное обозначение. Например, *441delA*, *485insTA*. При делеции или инсерции трех и более нуклеотидов указывается только их число. Так, *852del22* означает делецию 22 нуклеотидов, начиная с 852-го нуклеотида, а *3320ins7* обозначает вставку 7 нуклеотидов после нуклеотида 3320. В случае больших вставок или делеций их размеры указываются в т. п. н., например, *2115ins13 т. п. н.*, или обозначаются соответствующие вставленные/делетированные структурные элементы генома. Так, *2115insAlu* означает инсерцию *Alu*-элемента после нуклеотида 2115.

При обозначении сплайсинговых мутаций записывают номер крайнего нуклеотида в ближайшем к мутации экзоне, число нуклеотидов (со знаком «+» в случае 3'-конца экзона и со знаком «-» в случае 5'-конца) и характер нуклеотидной замены. Нуклеотиды экзонов обозначают



заглавными буквами, интронов — прописными. Отсчет нуклеотидов в молекуле ДНК начинается с первого смыслового кодона, так что нуклеотид под номером +1 соответствует первому нуклеотиду в молекуле ДНК. Вверх по течению (или справа налево от 3' к 5'-концу) от первого кодона нуклеотиды записывают со знаком «-», вниз по течению (от 5' к 3') — со знаком «+». Например, запись 711+5gt обозначает замену G на T в 5-м нуклеотиде интрона, следующего за экзоном, заканчивающимся с 711-го нуклеотида. Запись G39X означает замену глицина на стоп-сигнал в 39-м кодоне, а W1282X — триптофанового триплета на стоп-кодон в положении 1282. Утрату одной или нескольких аминокислот обозначают значком дельта ( $\Delta$ ). Так, наиболее частая мутация, приводящая к муковисцидозу, —  $\Delta F508$ , означает отсутствие фенилаланина в положении 508 трансмембранного регуляторного белка муковисцидоза. Таким же знаком обозначают делеции в ДНК. Знак  $\Delta$  также ставят перед обозначением гена, полностью инактивированного либо делецией, либо инсерцией (нуль-мутация). Полиморфизмы, связанные с равноценной по функциональной значимости аминокислот, записывают через косую черту, например, M/V470 — метионина на валин в положении 470.

*Литература:*

- Иванов В. И. и др. Генетика. М., ИКЦ «Академкнига», 2006. С. 234–242.
- Инге-Вечтомов С. Г. Генетика с основами селекции. Издательство Н-Л, СПб., 2010. С. 338–362.
- Клаг У., Каммингс М. Основы генетики. Изд-во «Техносфера», М., 2007. С. 453–460.

## Глава 3

### ХРОМОСОМНЫЕ МУТАЦИИ (АБЕРРАЦИИ)

Хромосомными мутациями или хромосомными абберациями или перестройками называются изменения структуры хромосом. Различают внутривхромосомные абберации (фрагментации, делеции, дупликации, инверсии, транспозиции) и межхромосомные (транслокации).

#### 3.1. Основные типы хромосомных аббераций

*Делеции* — потеря участка хромосомы с образованием центрического и ацентрического фрагментов. Делеция является результатом разрывов хромосом. При клеточных делениях фрагмент, содержащий центромеру, реплицируется, и его копии нормально распределяются по дочерним клеткам, тогда как ацентрический фрагмент утрачивается. Если разрывы происходят одновременно в обоих плечах хромосомы, то открытые концы центрического фрагмента могут соединиться с образованием кольцевой хромосомы. При этом оба ацентрических конца элиминируются. Потерю концевой, теломерного района хромосомы с прилегающим к нему участком называют *дефиценцией*.

Организмы, гетерозиготные по делеции, являются *гемизиготными* по утраченному локусу, поэтому все рецессивные гены проявляются фенотипически. Наличие делеции определяют цитологически. У гетерозигот по интерстициальной (внутренней) делеции при конъюгации гомологичных хромосом в мейозе более длинная нормальная хромосома образует петлю, а у гетерозигот по дефиценции одна из хромосом короче другой.

Для картирования делеций используются два подхода: 1) учет рекомбинантов в потомстве анализирующего скрещивания гетерозиготы по делеции и серии рецессивных мутаций; 2) анализ результатов скрещивания делеционного мутанта с серией тестеров с перекрывающимися делециями.

*Дупликации* — удвоения участков хромосом. Дополнительная копия участка хромосомы может располагаться сразу за тем районом, который

дуплицирован, тогда это *тандемная дупликация*, либо в новом месте или в другой хромосоме.

Тандемные дупликации появляются в половых клетках при мейозе в результате неравного кроссинговера (в этом случае второй гомолог несет делецию) или в соматических клетках в результате неаллельной гомологичной рекомбинации. Наиболее известный пример дупликации — мутация *Bar* у дрозофилы, обнаруженная в 20-х гг. XX в. Т. Морганом и А. Стертевантом. Мутация обусловлена дупликацией локуса 57.0 X-хромосомы. У нормальных самок ( $B^+/B^+$ ) глаз имеет 800 фасеток, у гетерозиготных самок ( $B^+/B$ ) глаз имеет 350 фасеток, у гомозигот по мутации ( $B/B$ ) — всего 70 фасеток. Обнаружены также самки с трижды повторенным геном — *double Bar* ( $B^D/B^+$ ).

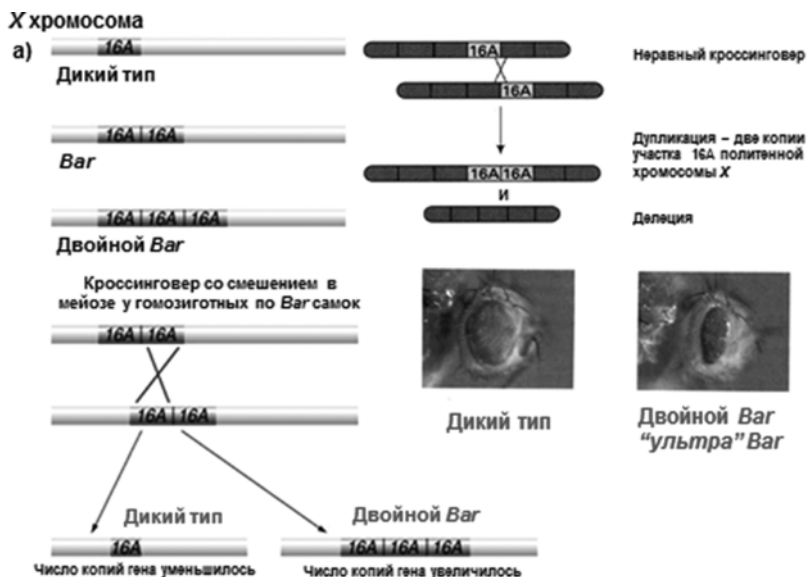


Рис. 3.1. Схема дупликации участка 16А X-хромосомы у дрозофилы

Считается, что дупликации — один из путей возникновения новых генов. Мутационные изменения в новых копиях генов могут накапливаться и приводить к появлению у них новых функций. Это может послужить материалом для отбора. В пользу этой идеи говорит близость ряда генов, кодирующих разные продукты, по нуклеотидному составу.